

**DENNY MARCEL SECCON**

**ANÁLISE DE UM CLONE METAGENÔMICO PRODUTOR DE  
COMPOSTOS POTENCIALMENTE BIOATIVOS**

**Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de Mestre em  
Ciências – Bioquímica, Curso de Pós-  
Graduação em Ciências – Bioquímica,  
Setor de Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná.**

**Orientador: Prof. Fabio Oliveira Pedrosa**

**Co-orientadores: Helisson Faoro  
Profa. Roseli Wassem**

**CURITIBA**

**2012**

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, sobretudo minha mãe, minha heroína eterna.

Aos meus orientadores, Prof. Fábio de Oliveira Pedrosa, Helisson Faoro e Profa. Roseli Wassem.

Aos professores do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela transmissão de conhecimento, pelo auxílio nos experimentos e pelas sugestões, sobretudo ao Prof. Marcelo Müller dos Santos pelo auxílio com as análises de MALDI-TOF e Q-TOF.

À Profa. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, por sua imprescindível ajuda com as análises para determinação de atividade antibiótica.

Aos técnicos do Departamento de Bioquímica, Válter, Roseli Prado e Alex.

Aos servidores públicos que prestam serviços ao Departamento de Bioquímica, sobretudo os que realizam serviços gerais.

À Marilza, por interceder meus contatos com o Prof. Fábio.

A todos os colegas de laboratório e departamento, e eu estaria sendo injusto se citasse nomes pois todos foram importantes.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

A Tatiane Fidelis, que não deixou de acreditar em mim e me ajudou, indiretamente, a redescobrir sobre o que a vida é de fato. Mesmo sendo esse seu trabalho, você foi além, muito além.

Quero servir, quero ensinar, eu vim pra aprender.  
- O Viajante, Forfun

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>x</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>1      INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>1</b>
<b>2      REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>2</b>
2.1    METAGENÔMICA .....	2
2.1.1   Construção de uma Biblioteca Metagenômica .....	4
2.1.2   Prospecção .....	7
2.1.3   Importância Biotecnológica da Metagenômica .....	8
2.2    CARACTERIZAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS COLORIDOS .....	10
2.2.1   4-Hidroxifenilpiruvato Dioxigenase (4-HPPD) .....	10
2.2.2   Relação de 4-HPDD com o Composto Marrom .....	12
2.2.3   Piomelanina .....	13
2.2.4   Turbomicinas .....	14
2.2.4.1   Atividades biológicas das turbomicinas .....	15
2.2.4.1.1   Atividade antibiótica .....	15
2.2.4.1.2   Atividade antitumoral .....	18
2.2.5   Biblioteca Metagenômica de Solo (GLOGAUER, 2011) .....	20
<b>3      OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
3.1    OBJETIVO PRINCIPAL .....	23
3.2    OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>4      MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>

4.1	ESTIRPES DE MICRORGANISMOS E VETORES .....	24
4.2	MATERIAL GERAL .....	26
4.2.1	Meios de Cultivo .....	26
4.2.2	Antibióticos .....	27
4.3	SEQUENCIAMENTO DO FOSMÍDEO pM01 .....	27
4.3.1	Manipulação de DNA.....	27
4.3.2	Extração e Purificação de DNA Fosmidial e Plasmidial .....	28
4.3.3	Fragmentação, Reparo e Fosforilação de DNA Fosmidial por Nebulização .....	29
4.3.4	Seleção e Purificação de Fragmentos para Construção das Sub-bibliotecas de Fragmentos de Nebulização .....	30
4.3.5	Reações de Restrição do DNA Fosmidial e dos Vetores de Clonagem .	31
4.3.6	Preparo de Células Eletrocompetentes e Transformação .....	31
4.3.7	Montagem e Manutenção das Sub-bibliotecas .....	31
4.3.8	Confirmação da Presença de Inserto .....	32
4.3.9	Sequenciamento de DNA .....	32
4.4	BIOINFORMÁTICA .....	33
4.4.1	Montagem das Leituras Obtidas em Contigs e Scaffolds .....	33
4.4.2	Anotação dos Contigs .....	33
4.4.3	Construção das Árvores Taxonômicas .....	33
4.5	CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO MARROM .....	34
4.5.1	Produção e Extração do Composto Marrom em Larga Escala .....	34
4.5.2	Fracionamento do Composto Marrom .....	35
4.5.3	Ensaio para Efeito Antibiótico .....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>39</b>

5.1	PREDIÇÃO DO TAMANHO DO INSERTO DO FOSMÍDEO	
	PM01 .....	39
5.2	CONSTRUÇÃO E SEQUENCIAMENTO DAS	
	SUB-BIBLIOTECAS .....	40
5.3	ANOTAÇÃO DOS CONTIGS .....	43
5.4	IDENTIFICAÇÃO DO(S) GENE(S) RESPONSÁVEIS	
	PELO FENÓTIPO .....	46
5.4.1	Contig 21 .....	49
5.5	PRODUÇÃO DO COMPOSTO MARROM .....	50
5.6	EXTRAÇÃO DO COMPOSTO MARROM .....	51
5.7	FRACIONAMENTO DO COMPOSTO MARROM .....	55
5.8	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	
	DAS TURBOMICINAS ISOLADAS .....	59
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>64</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DAS TURBOMICINAS A E B .....	16
TABELA 2 –	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA TURBOMICINA A (1A) E DERIVADOS .....	17
TABELA 3 –	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA TURBOMICINA A (1A) E DERIVADOS .....	18
TABELA 4 –	EFEITO CITOTÓXICO DA TURBOMICINA A (1A) E DERIVADOS .....	19
TABELA 5 –	ESTIRPES DE MICROORGANISMOS .....	24
TABELA 6 –	VETORES .....	25
TABELA 7 –	FOSMÍDEOS E PLASMÍDEOS .....	25
TABELA 8 –	COMPOSIÇÃO EM RAZÃO VOLUMÉTRICA DOS SOLVENTES SERIADOS USADOS COMO ELUENTE NA PURIFICAÇÃO DAS TURBOMICINAS.....	37
TABELA 9 –	ANOTAÇÃO DOS CONTIGS .....	44
TABELA 10 –	RESULTADO DE BLAST PARA A ORF1 .....	47
TABELA 11 –	ANTIBIOGRAMA PARA A FRAÇÃO TBA PURIFICADAS .....	59

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	MÉTODO CLÁSSICO PARA ESTUDO DE MICRORGANISMOS .....	2
FIGURA 2 –	MÉTODO DIRETO E INDIRETO PARA CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA .....	5
GRÁFICO 1 –	EVOLUÇÃO NA QUANTIDADE DE ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EM JORNAIS SOBRE METAGENÔMICA E BIOTECNOLOGIA – 2002-2012 .....	9
FIGURA 3 –	VIA CATABÓLICA DA TIROSINA .....	11
FIGURA 4 –	ÁCIDO BENZOQUINOACÉTICO .....	13
FIGURA 5 –	FÓRMULAS ESTRUTURAIS DAS TURBOMICINAS A E B .....	14
FIGURA 6 –	VIA DE SÍNTESE PROPOSTA PARA A GERAÇÃO DAS TURBOMICINAS .....	15
FIGURA 7 –	MOLÉCULAS DE TRIS(1-ALQUILINDOL-3-IL)METÍLIO SINTETIZADAS E TESTADAS .....	17
GRÁFICO 2 –	EFEITO DO COMPOSTO MARROM COMO POTENCIAL AGENTE ANSIOLÍTICO .....	22
FIGURA 8 –	PERFIL DE RESTRIÇÃO DO FOSMÍDEO pM01 COM A ENZIMA <i>EcoRI</i> .....	39
FIGURA 9 –	PERFIL DE NEBULIZAÇÃO DO FOSMÍDEO pM01 .....	40
FIGURA 10 –	PERFIL DE RESTRIÇÃO DO FOSMÍDEO pM01 COM AS ENZIMAS <i>EcoRI</i> , <i>PstI</i> E <i>XbaI</i> .....	41
FIGURA 11 –	PREDIÇÃO DE PRESENÇA DE INSERTO NOS CLONES REFERENTES A UMA PLACA DE 96 POÇOS OBTIDA .....	42
FIGURA 12 –	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS 22 CONTIGS E 14 SCAFFOLDS MONTADOS .....	43
FIGURA 13 –	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA LOCALIZAÇÃO DA ORF1, ESSENCIAL PARA A PRODUÇÃO DO COMPOSTO MARROM .....	46
FIGURA 14 –	ÁRVORE TAXONÔMICA PARA A ENZIMA 4-HPPD CODIFICADA PELA ORF1 .....	48
FIGURA 15 –	REAÇÃO CATALISADA PELA FENILALANINA-4-HIDROXILASE .....	49
FIGURA 16 –	REGIÃO DO CONTIG 21 (BASES 1 A APROXIMADAMENTE 4000) .....	49
FIGURA 17 –	PRODUÇÃO DO COMPOSTO MARROM EM DIFERENTES PHs .....	50
FIGURA 18 –	PRODUÇÃO DO COMPOSTO MARROM EM MEIO MÍNIMO (M9) SUPLEMENTADO COM EXTRATO DE LEVEDURA .....	51
FIGURA 19 –	ESPECTROGRAMA DE MASSA/CARGA OBTIDO PARA O COMPOSTO MARROM BRUTO POR Q-TOF .....	52
FIGURA 20 –	ESPECTROGRAMA DE MASSA/CARGA OBTIDO PARA OS FRAGMENTOS DO PICO COM M/Z 360,1550 POR QTOF .....	52
FIGURA 21 –	ESPECTROGRAMA DE MASSA/CARGA OBTIDOS PARA O COMPOSTO MARROM BRUTO POR MALDI-TOF .....	53
FIGURA 22 –	SOLUBILIDADE DO COMPOSTO MARROM EM DIFERENTES SOLVENTES AQUOSOS (A-F) E ORGÂNICOS (G-L) .....	54
FIGURA 23 –	CROMATOGRAMA RESOLVIDO POR TLC DO MATERIAL SOLUBILIZADO NOS DIFERENTES SOLVENTES .....	54
FIGURA 24 –	ESPECTROGRAMAS DE MASSA/CARGA OBTIDOS PARA AS FRAÇÕES 1-10 APÓS FRACIONAMENTO DO COMPOSTO MARROM POR CROMATOGRAFIA DE FASE NORMAL .....	56
FIGURA 25 –	ESPECTROGRAMAS DE MASSA/CARGA OBTIDOS PARA AS FRAÇÕES 1-10 APÓS FRACIONAMENTO DA TURBOMICINA A POR CROMATOGRAFIA DE FASE NORMAL .....	57



FIGURA 26 – ESPECTROGRAMAS DE MASSA/CARGA OBTIDOS PARA AS FRAÇÕES 1-10 APÓS FRACIONAMENTO DA TURBOMICINA B POR CROMATOGRAFIA DE FASE NORMAL .....	58
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## RESUMO

Durante a prospecção por lipases em uma biblioteca metagenômica foram obtidos clones sem atividade lipolítica mas com fenótipo diferenciado visivelmente detectável. O clone M01, produtor de um composto marrom com alto rendimento mesmo em condições laboratoriais, foi investigado. O inserto foi quase totalmente sequenciado e, através de mutação, foi possível identificar que uma única ORF, homóloga a 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4-HPPD), conferia ao clone a capacidade de sintetizar o composto marrom. Nenhum outro gene relacionado foi encontrado, mas três ORFs encontradas codificando para proteases podem representar alvos de estudo com potencial biotecnológico. 4-HPPD é a segunda enzima da via catabólica da tirosina, convertendo hidroxifenilpiruvato (HPP) a homogentisato (HGA). Quando a produção é alta, HGA é excretado da célula, sofrendo auto-oxidação e auto-polimerização, gerando piomelanina, composto de coloração marrom. Em paralelo à produção de piomelanina e na presença de indol, através de um mecanismo ainda não desvendado, o organismo hospedeiro pode gerar duas moléculas coloridas com atividade antibiótica e citotóxica, turbomicina A e turbomicina B. Essas moléculas foram obtidas através de abordagem metagenômica apenas recentemente e são muito pouco estudadas, representando possíveis novos compostos com atividade biológica. A quantidade de composto marrom sintetizada pelo clone é uma função da composição do meio de cultivo e dos pHs iniciais testados, o que sinaliza a possibilidade de otimização da produção. A solubilidade do composto marrom e das turbomicinas é diferencial em função da polaridade e do pH dos solventes testados, sugerindo margem para otimização da extração e purificação. O composto marrom produzido pelo clone M01 foi extraído e fracionado até a obtenção de formas purificadas das turbomicinas. A pureza relativa e identidade das moléculas foram confirmadas por TLC, MALDI-TOF e Q-TOF. A turbomicina A teve seu potencial antibacteriano avaliado, apresentando resultado positivo contra as estirpes Gram-positivas testadas.

## ABSTRACT

During the prospection for lipases in a metagenomic library some of the clones obtained had no lipolytic activity but showed a visually detectable differentiated phenotype. Clone M01, which produced a brown pigment with high yield even in laboratory conditions, was investigated. The insert was almost entirely sequenced and, through mutation, it was possible to determine that one single ORF, homologue to 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4-HPPD), conferred the clone the ability to produce the brown pigment. No other related gene was found, but three ORFs found coding for proteases might represent targets to be studied for their biotechnological potential. 4-HPPD is the second enzyme in the catabolic pathway of tyrosine, converting hydroxyphenylpyruvate (HPP) to homogentisate (HGA). When the production is high, HGA is excreted from the cell, undergoing an auto-oxidation and auto-polymerization process that yields pyomelanin, a brown compound. Parallel to the production of pyomelanin and in the presence of indol, through a mechanism yet not elucidated, the host organism can generate two colored molecules with antibiotic and cytotoxic activity, turbomycin A and turbomycin B. These molecules were obtained only recently through metagenomic research and are as yet poorly studied, representing possible new compounds with biologic activity. The quantity of the brown pigment synthesized by the clone is a function of the composition of the growth medium broth and the initial pH, which signalizes a possibility for optimizing production. The solubility of the brown pigment and the turbomycins differs according to the polarity and the pH of the solvents tested, suggesting that the extraction and purification can also be optimized. The brown compound produced by clone M01 was extracted and fractionated to achieve purified forms of the turbomycins. The relative purity and the identity of the molecules were confirmed by TLC, MALDI-TOF and Q-TOF. Turbomycin A had its antibacterial potential evaluated, showing positive activity against the Gram-positive strains tested.

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A grande maioria da biodiversidade microbiana não pode ser objeto de estudo ou tem seu potencial biotecnológico inexplorado em função da impossibilidade de isolar e manter esses microrganismos em condições laboratoriais. Assim sendo, a metagenômica tem se mostrado uma importante ferramenta alternativa. A técnica consiste na extração do DNA total de uma amostra ambiental, que representa a comunidade microbiana daquele ambiente, e sua clonagem em vetores que podem ser inseridos em microrganismos cultiváveis clássicos. Dessa forma é possível estudar a informação genética original daquela amostra através das técnicas de biologia molecular ou o fenótipo conferido pelo genótipo ambiental caso o fragmento de DNA clonado se revele funcional no microrganismo transformado.

A prospecção funcional é geralmente voltada para uma atividade ou fenótipo desejado, entretanto não é incomum obter clones com fenótipo inesperado facilmente observável mesmo em condições não otimizadas de cultivo. Um dos fenótipos encontrados de forma recorrente é a produção de compostos coloridos. Compostos coloridos produzidos por microrganismos são geralmente visíveis nessas condições quando o rendimento é alto, e essas moléculas podem apresentar atividades biológicas diversas, características que lhes confere uma potencial aplicação prática.

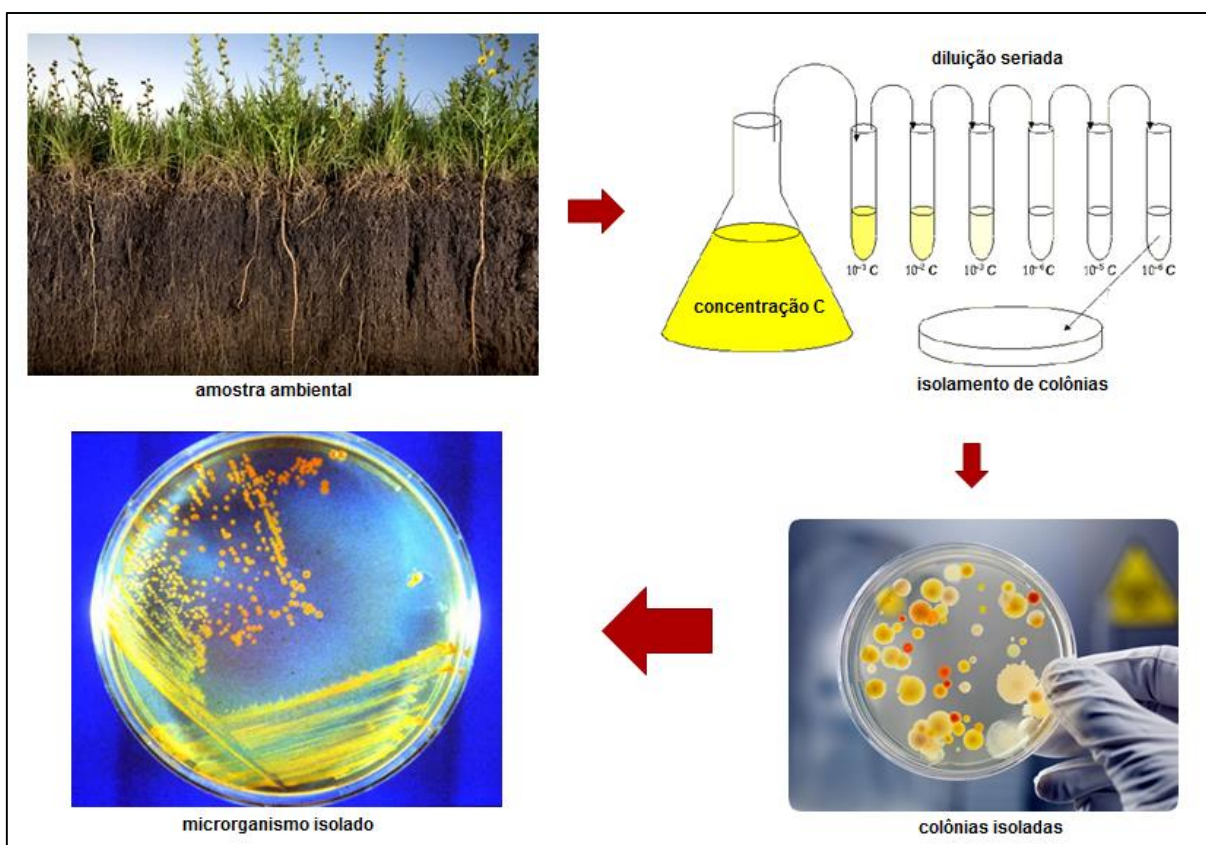
GLOGAUER (2011) construiu uma biblioteca metagenômica a partir de uma amostra de solo com alto teor lipídico, com o objetivo principal de realizar a prospecção de atividade lipolítica. Dessa forma foi possível isolar e caracterizar clones produtores de lipases com novas propriedades de possível interesse industrial. Dois dos clones sem atividade lipolítica produziam um halo marrom quando cultivados em meio sólido. O objetivo desse trabalho foi identificar o gene ou a via responsável pela produção do composto marrom de um desses clones, denominado M01, e caracterizar o composto produzido.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 METAGENÔMICA

Classicamente, o estudo de um microrganismo e sua interação com o ambiente, além da exploração de seu potencial biotecnológico como fornecedor de novas moléculas e enzimas, depende de seu isolamento e manutenção em meio de cultura. Uma amostra ambiental contendo toda uma biodiversidade microbiana deve ser preparada em uma solução líquida adequada, diluída seriadamente, cultivada em condições laboratoriais para isolamento dos microrganismos e, a partir daí, é possível isolar e caracterizar um microrganismo específico (Figura 1).

FIGURA 1 - MÉTODO CLÁSSICO PARA ESTUDO DE MICRORGANISMOS



FONTE: AUTOR, 2012.

Entretanto, o sequenciamento de genes de rRNA de microrganismos presentes em diversas amostras ambientais tem revelado uma diversidade muito maior do que aquela observada para os microrganismos isolados pela técnica tradicional. Através dessa abordagem, é possível estimar que, por exemplo, 0,1% ou menos dos microrganismos do solo são prontamente cultiváveis (TORSKIV *et al.*, 1994). Novos grupos de bactérias que têm sido identificados parecem ser tão divergentes das bactérias cultivadas que eles poderiam representar novos filos, ou mesmo novos reinos de vida (KUSKE, BARNS & BUSCH, 1997). Além disso, o isolamento tradicional apresenta algumas limitações (AMANN *et al.*, 1995):

- os microrganismos isolados podem não representar integralmente a comunidade, uma vez que podem estar presentes em quantidade relativa tão pequena que podem ser eliminados por competição com os outros microrganismos durante as etapas de isolamento, ou ainda podem ser perdidos durante as etapas de diluição;
- não são conhecidos os parâmetros físico-químicos para crescimento e manutenção do microrganismo em condições artificiais;
- alguns microrganismos dependem de complexas interações com o ambiente (como, por exemplo, simbiose ou parasitismo) para sobreviver.

Dessa forma, a abordagem clássica para estudo de novos microrganismos necessita do desenvolvimento de novos métodos de cultura, o que pode ser lento e tedioso e demandará mais conhecimento da fisiologia dos microrganismos ainda desconhecidos. A metagenômica, definida por HANDELSMAN *et al.* (1998) como a análise funcional e/ou baseada na sequência dos genomas microbianos coletivos contidos numa amostra ambiental, surge como alternativa para o estudo e exploração dessa grande parcela desconhecida do mundo microbiano. Ela é uma técnica que se tornou possível graças aos avanços da biologia molecular, e trata do isolamento do genoma ambiental (eDNA, sigla em inglês para DNA ambiental), clonagem de grandes fragmentos e inserção em um organismo prontamente

cultivável (como, por exemplo, *Escherichia coli*) e posterior estudo genotípico ou fenotípico dos transformantes.

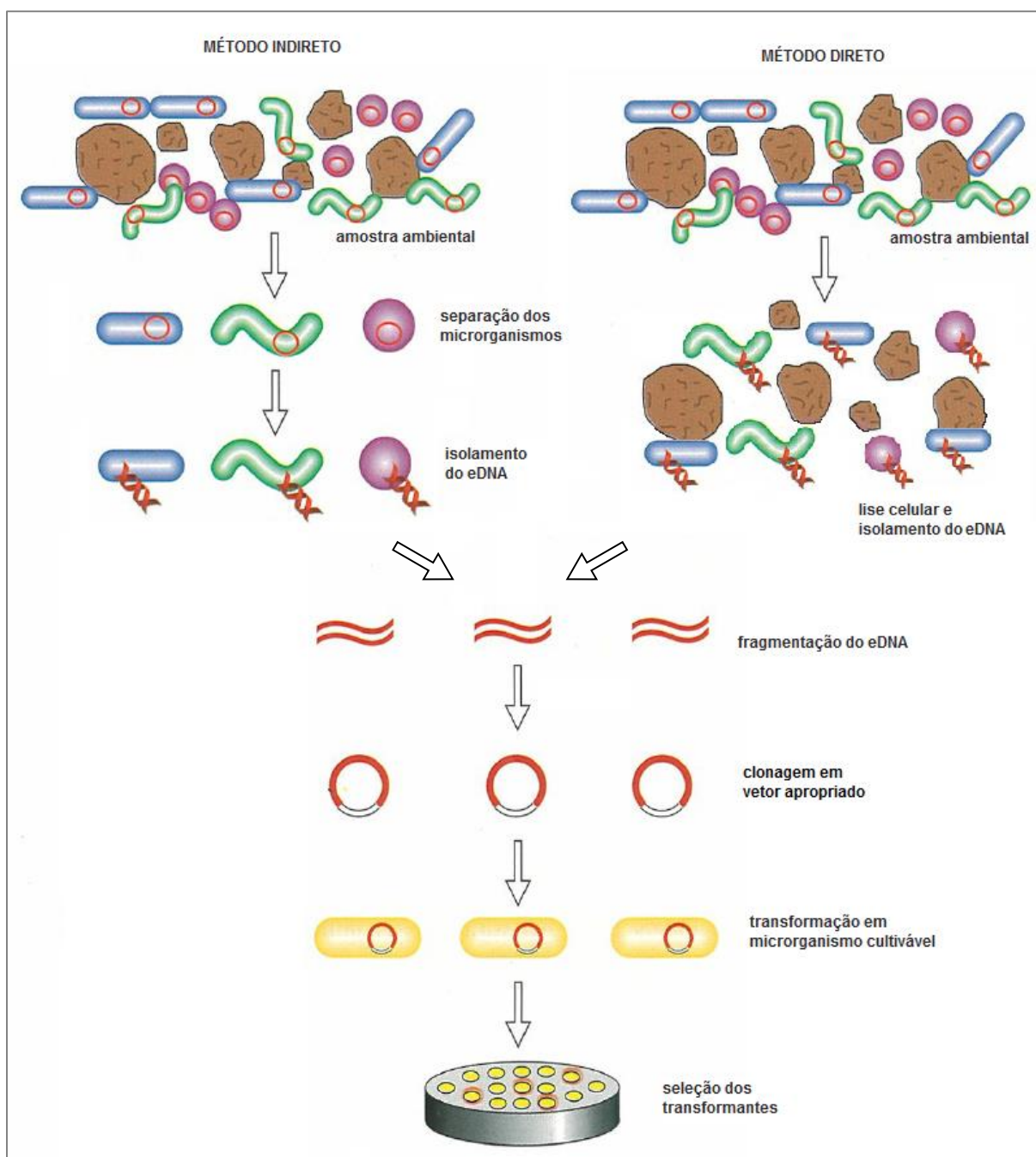
### 2.1.1 Construção de uma Biblioteca Metagenômica

A primeira etapa para o estudo do metagenoma de um ambiente é a construção de uma biblioteca metagenômica. As duas metodologias mais utilizadas foram descritas por DANIEL (2005) como método indireto e direto. No método indireto, as células são primeiro separadas dos contaminantes da amostra para então serem lisadas. Se por um lado há o risco de perder parte das células durante o isolamento, por outro o DNA ambiental (eDNA) liberado estará livre de contaminantes da matriz amostral que podem inibir as etapas subsequentes de clonagem. Além disso, uma vez que as células estejam separadas, é possível selecionar microrganismos procarióticos através de centrifugação diferencial, sendo essa uma etapa extra de seleção dos genomas a serem clonados. No método direto, a amostra ambiental é recuperada e submetida a condições que promovam a lise das células presentes e liberação dos genomas; na sequência, o eDNA é separado dos restos celulares e de contaminantes da matriz para posterior clonagem. A principal vantagem é que não ocorre perda de diversidade microbiana na primeira etapa de lavagem, entretanto pode ocorrer quebra excessiva do metagenoma em função do método de lise celular escolhido, e o eDNA liberado pode interagir com partículas contaminantes da matriz que sejam inibidoras das etapas de clonagem.

A partir do eDNA isolado, as etapas seguintes são as mesmas: os genomas presentes são fragmentados, clonados em um vetor apropriado, transformados em uma cepa cultivável e selecionados em meio de cultura e/ou condições apropriadas.

A Figura 2 resume as principais etapas dos métodos indireto e direto para construção de uma biblioteca metagenômica.

FIGURA 2 - MÉTODO DIRETO E INDIRETO PARA CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA METAGENÔMICA



FONTE: HANDELSMAN *et al.*, 1998.

A fragmentação do eDNA pode ser realizada mecânica ou enzimaticamente. O método mecânico geralmente empregado é o de nebulização, onde o eDNA é submetido a condições de pressão e tempo que promovam quebras aleatórias gerando fragmentos de tamanho variado. A fragmentação por nebulização



necessita de uma etapa de reparo enzimático das extremidades dos fragmentos gerados para que essas pontas fiquem cegas, possibilitando sua posterior clonagem. O método enzimático se baseia na digestão do eDNA com enzimas de restrição, e as pontas coesivas geradas auxiliam na clonagem subsequente. Um fator importante a ser considerado é o tamanho do inserto a ser clonado. No caso de insertos menores, as etapas de purificação desse DNA de baixo peso molecular são menos agressivas ao DNA a ser purificado e os vetores utilizados são de alto número de cópias, aumentando o rendimento tanto do material genético quanto da expressão do fenótipo. Além disso, clones com insertos pequenos identificados numa prospecção funcional facilitam o estudo do DNA clonado uma vez que a informação genética está restrita a um menor número de pares de base. A principal desvantagem é que fenótipos que dependam de mais de um gene podem não ser identificados por esse procedimento, além de as bibliotecas construídas serem tipicamente maiores. Insertos maiores (acima de 10 kb) permitem a identificação de vias metabólicas inteiras e as bibliotecas geradas contêm menos clones, o que facilita a etapa de prospecção. Entretanto, as etapas de purificação de DNA de alto peso molecular são mais difíceis e os vetores utilizados são geralmente de baixo número de cópias. Insertos grandes podem ser novamente fragmentados e subclonados em vetores com alto número de cópias para facilitar o levantamento da informação genética contida no clone original.

Na etapa de clonagem, o principal cuidado a ser tomado é com a escolha do vetor apropriado. BACs, cosmídeos e foscídeos são os vetores de escolha para insertos maiores (acima de 10 kb). Plasmídeos são preferidos para insertos menores (abaixo de 8 kb). Além disso, o vetor deve ser compatível com o microrganismo escolhido para a transformação.

Na etapa de transformação, é preciso levar em conta que o eDNA estará sendo submetido a expressão heteróloga, ou seja, a expressão ocorre em um organismo diferente do organismo original. Em razão disso, principalmente quando se realiza prospecção funcional, pode ser necessário transformar o eDNA clonado em mais de um microrganismo, levando em consideração a

compatibilidade dele com o metagenoma de interesse. A bactéria mais utilizada é *Escherichia coli*, que pertence ao filo *Proteobacteria*. Entretanto, a expressão genética em *E. coli* não está limitada aos genes desse filo, sendo esse microrganismo o mais utilizado como hospedeiro. Mesmo assim, a expressão dos fenótipos do metagenoma pode ser otimizada com a construção de bibliotecas adicionais em *Streptomyces*, *Bacillus* e *Archaea*, por exemplo (HANDELSMAN et al., 1998).

A seleção dos transformantes é realizada em função de o vetor utilizado conferir fenótipo diferenciado, geralmente resistência a determinado antibiótico.

### 2.1.2 Prospecção

Duas abordagens, a prospecção baseada na sequência e a prospecção baseada na função, foram desenvolvidas para extrair informação biológica das bibliotecas metagenômicas (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2003). A análise baseada na sequência depende do uso de sequências conservadas de DNA para desenvolver sondas de hibridização ou iniciadores de PCR com o objetivo de localizar na biblioteca metagenômica clones que contenham sequências de interesse. Outra possibilidade é o sequenciamento integral da biblioteca metagenômica e a anotação dos genes presentes através de comparação com genes homólogos depositados nas bases de dados disponíveis. Suas principais limitações são que a quantidade de informação a ser processada é geralmente muito grande, a prospecção não é muito direcionada, só são descobertos genes homólogos àqueles já depositados nos bancos de dados e a presença de um gene de interesse na biblioteca não garante sua tradução funcional naquele ambiente heterólogo. A análise baseada na função começa com a identificação dos clones que expressam uma característica desejada, seguida da caracterização dos clones ativos através de análise de sequência e bioquímica. Essa abordagem permite a rápida identificação de clones que tenham aplicações biotecnológicas potenciais. Suas limitações se devem ao fato de que a função de interesse pode não ser corretamente expressa no

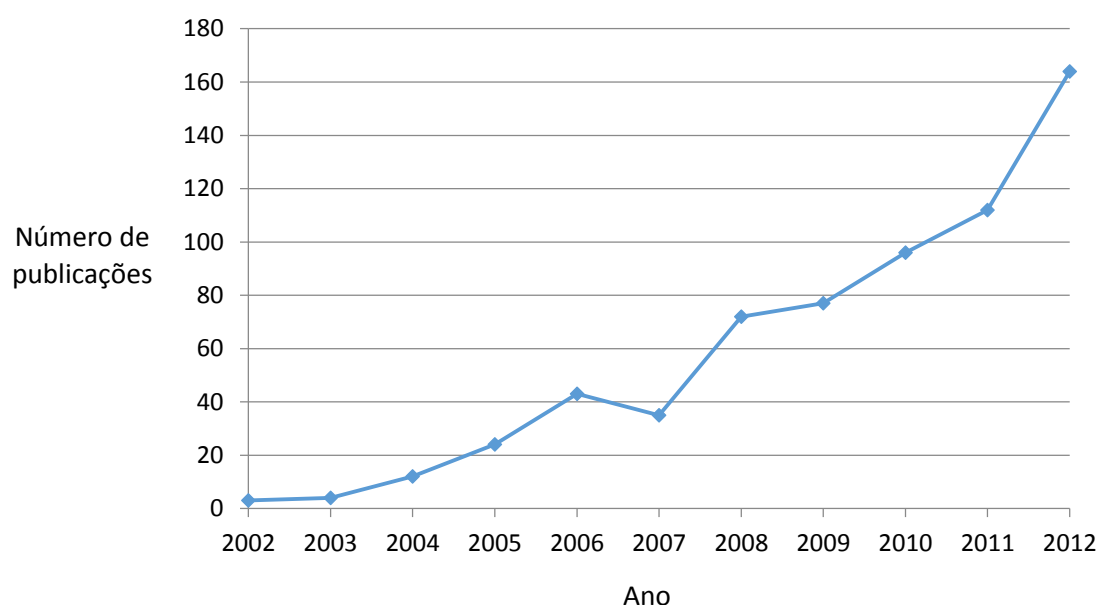
ambiente heterólogo do organismo hospedeiro e a função pode depender da presença de mais de um gene, os quais podem não estar todos presentes em um clone isolado. Ela também depende da disponibilidade de um teste para a função desejada que possa ser aplicado eficientemente em bibliotecas vastas, já que a frequência de clones ativos é bastante pequena. Bibliotecas com insertos grandes são menores em número e a prospecção funcional é mais eficiente, mas o estudo genético de um clone com fenótipo desejado fica dificultado justamente em função do tamanho do inserto.

### 2.1.3 Importância Biotecnológica da Metagenômica

A taxa recente de descoberta de novos produtos naturais a partir da microbiota ambiental tem sido bastante baixa, principalmente porque o cultivo tradicional tem recuperado os mesmos organismos repetidamente. Em actinomicetos, por exemplo, a taxa de redescoberta para antibióticos é de 99% (ZAEHNER & FIEDLER, 1995). Em função disso, a metagenômica se apresenta como uma alternativa viável para a exploração do potencial biotecnológico desconhecido presente no mundo microbiano não cultivável.

O Gráfico 1 apresenta a evolução no número de artigos publicados em jornais que são resultado da pesquisa utilizando a busca “metagenômica e biotecnologia” (*metagenomics and biotechnology*). Fica evidente o crescente interesse da comunidade científica pelo tema.

GRÁFICO 1 - EVOLUÇÃO NA QUANTIDADE DE ARTIGOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS EM JORNAIS SOBRE METAGENÔMICA E BIOTECNOLOGIA – 2002-2012



FONTE: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com), 08/10/2012.

Vários novos produtos naturais de interesse biotecnológico foram descobertos através dessa abordagem, como esterases (XINMIN *et al.*, 2008, PENG *et al.*, 2011, FAN, LIU e LIU, 2012), celulasas (PANG *et al.*, 2009, POTTKAEMPER *et al.*, 2009), amilases (SHARMA, KHAN e QAZI, 2010), lipases (ELEND *et al.*, 2007, GLOGAUER *et al.*, 2011), hidrolases (BIJTENHOORN *et al.*, 2011), enzimas diversas (LEE *et al.*, 2008), um fator ativador de plaquetas (NAVARRO-FERNANDEZ, 2011), isoprenoides, ácidos graxos poliinsaturados e flavonoides (CHEMLER, YAN e KOFFAS, 2006) e antibióticos como glicopeptídeos (BANIK e BRADY, 2008) e policetídeos (PARSLEY *et al.*, 2011, NIKOLOULI e MOSSIALOS, 2012).

Novas abordagens já têm sido desenvolvidas a partir dos princípios da metagenômica, como o monitoramento da eficiência da biorremediação de urânio através de perfil proteogenômico (WILKINS *et al.*, 2009) e a procura de biomarcadores para diabetes tipo 2 através da mudança do perfil microbiótico do intestino (QIN *et al.*, 2012).

## 2.2 CARACTERIZAÇÃO DE BIOCOMPOSTOS COLORIDOS

RONDON *et al.* (2000) construíram duas bibliotecas metagenômicas a partir de uma amostra de solo. Três dos clones obtidos produziam composto marrom. GILLESPIE *et al.* (2002) realizaram a caracterização de um desses clones.

É de conhecimento comum que a presença de um composto marrom numa cultura microbiana sugere a produção de algum polímero melanínico. Dessa forma, GILLESPIE *et al.* (2002) partiram do protocolo sugerido por GIBSON e GEORGE (1998) para precipitação de compostos melanínicos, no qual a alcalinização da solução aquosa contendo melanina solúvel promove sua total polimerização, e a subsequente acidificação provoca sua precipitação. O precipitado foi ressuspense em metanol e a fração solúvel foi fracionada através de cromatografia de coluna em fase normal. Ao final do processo, GILLESPIE *et al.* (2002) conseguiram identificar dois pigmentos, turbomicina A (cor laranja) e turbomicina B (cor vermelha), que co-precipitaram com o composto melanínico produzido pelo clone. Essa foi a primeira vez que a turbomicina A foi obtida por abordagem metagenômica, e a primeira vez que a turbomicina B foi encontrada como produto biológico.

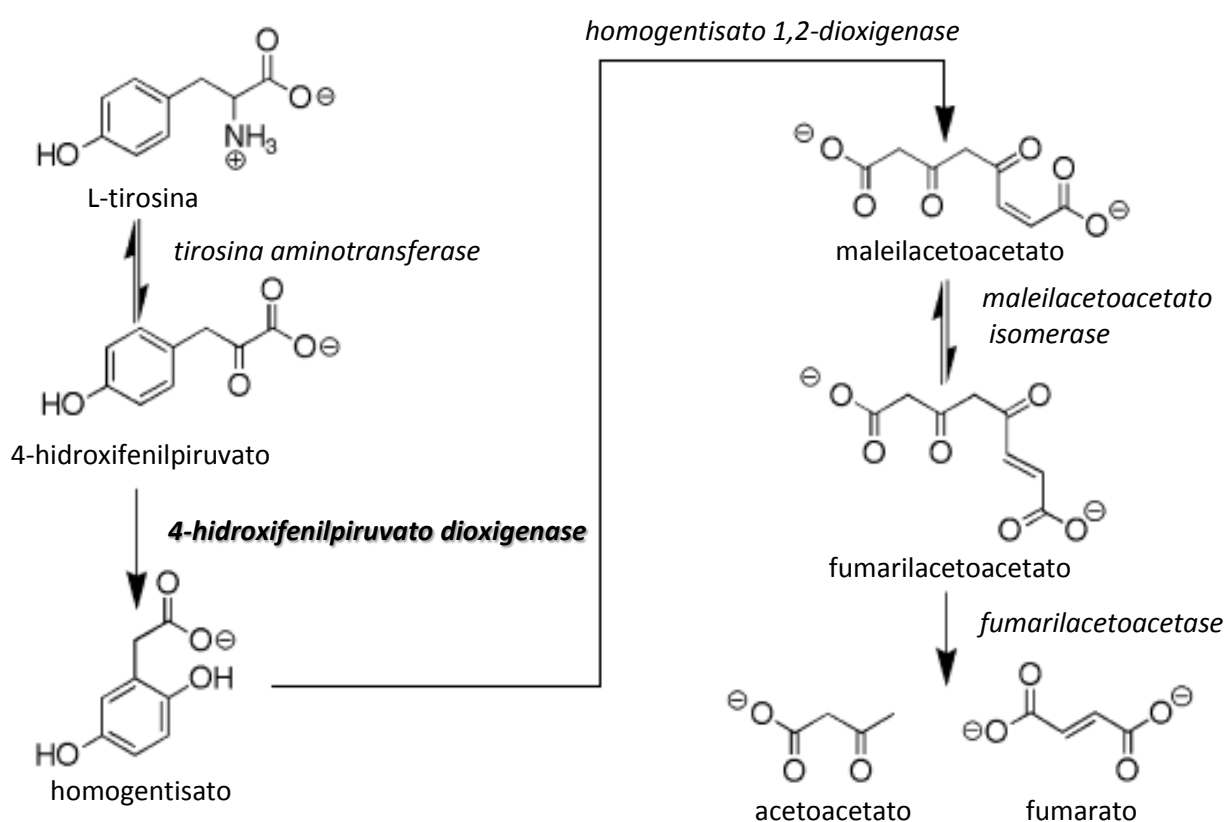
### 2.2.1 4-Hidroxifenilpiruvato Dioxigenase (4-HPPD)

Através de protocolos de mutagênese com transposon, GILLESPIE *et al.* (2002) identificaram que uma única ORF era responsável pela produção do composto marrom. A comparação da sequência dessa ORF com os bancos de dados, através da ferramenta BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990), revelou identidade na faixa de 45-54% e similaridade na faixa de 63-71% com enzimas pertencentes à família de 4-HPPD (4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase).

4-HPPD é a enzima responsável pela conversão de 4-hidroxifenilpiruvato (HPP) a 2,5-dihidroxifenilacetato (ou homogentisato, HGA) no metabolismo

aeróbico. Apesar de a reação catalisada ser única na natureza e envolver a descarboxilação, hidroxilação aromática e migração de substituinte em um único ciclo catalítico, ela é similar àquelas catalisadas pelas enzimas da superfamília de oxigenases  $\alpha$ -cetoácido dependentes (HAUSINGER, 2004). Essa conversão corresponde ao segundo passo na via catabólica que produz acetoacetato e fumarato a partir de L-tirosina (Figura 3, KNOX e EDWARDS, 1955).

FIGURA 3 - VIA CATABÓLICA DA TIROSINA



Acetoacetato e fumarato têm papel direto no metabolismo energético. Em organismos superiores, essa via desempenha adicionalmente outros papéis. Em animais, ela é necessária para modular os níveis sanguíneos de tirosina, e o acúmulo de intermediários devido ao mau funcionamento de algumas dessas enzimas causa doenças como tirosinemia, hawkinsinúria e alcaptonúria (GISSSEN *et al.*, 2003). Nas plantas, HGA é precursor para a síntese de cofatores essenciais

como plastoquinona e tocoferol (GOODWIN e MERCER, 1983). Dessa forma, a inibição de 4-HPPD pode aliviar os sintomas dessas síndromes em animais ou inibir o crescimento de plantas (efeito herbicida). Tem sido demonstrado que 4-HPPD tem baixa especificidade de substrato, reconhecendo uma gama de  $\alpha$ -cetoácidos polares e não polares como substrato (MORAN, 2005).

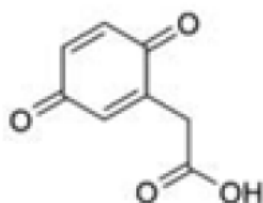
As regiões N- e C-terminais de 4-HPPD possuem domínios conservados, denominados *HPPD-N like* e *HPPD-C like*, respectivamente (BROWNLEE *et al.*, 2004; YANG *et al.*, 2004). Esses domínios também estão presente na enzima hidroximandelato sintase (HMAS). Ambas as enzimas são dioxigenases dependentes de ferro não-heme e agem sobre 4-HPP, entretanto a última catalisa a formação de 4-hidroximandelato (4-HMA), precursor para a formação de hidroxifenilglicerina, um componente estrutural de antibióticos peptídicos macrocíclicos não-ribossomais, como vancomicina. Ambas as enzimas são exceções à superfamília de oxigenases  $\alpha$ -cetoácido dependentes, pois requerem dois substratos ao invés de três, não usam  $\alpha$ -cetoglutarato e incorporam ambos os átomos de dioxigênio no produto aromático. Elas também exibem topologia de barril  $\beta$  duplicada em seus domínios N- e C-terminais que apresentam similaridade de sequência, o que sugere duplicação gênica. Cada proteína possui apenas um sítio catalítico localizado na região C-terminal, cuja estrutura primária é mais conservada. A região N-terminal é mais variável e sua função ainda é desconhecida.

### 2.2.2 Relação de 4-HPPD com o Composto Marrom

Quando ocorre acúmulo de HGA, o produto da reação catalisada por 4-HPPD, este é excretado e, em condições oxidantes, é capaz de sofrer oxidação espontânea, gerando ácido benzoquinoacético (Figura 4), o qual se autopolimeriza, gerando HGA-melanina, também chamada de piomelanina (YABUUCHI e OHYAMA, 1972; RUZAFI *et al.*, 1994; COON *et al.*, 1994; FUQUA *et al.*, 1991), de coloração marrom. GILLESPIE *et al.* (2002)

confirmaram experimentalmente que a presença de HGA em condições oxidantes é suficiente para a geração do composto marrom produzido por seu clone metagenômico. Além disso, as proteínas homólogas mais similares aos produtos das ORFs encontradas por GILLESPIE *et al.* (2002) nos seus três clones também são responsáveis por esse fenótipo: legiolisina em *Legionella pneumophila* (WINTERMEYER *et al.*, 1994), hemolisina em *Vibrio vulnificus* (CHANG *et al.*, 1997), 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase em *Pseudomonas* sp. (RUETSCHI *et al.*, 1992) e MelA em *Shewanella colwelliana* (FUQUA *et al.*, 1991).

FIGURA 4 - ÁCIDO BENZOQUINOACÉTICO



### 2.2.3 Piomelanina

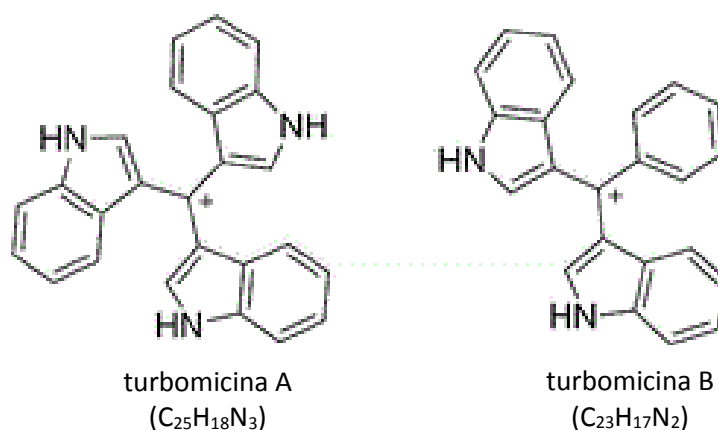
Em microrganismos, a função primária das melaninas é como mecanismo de proteção contra a radiação ultravioleta, já que são eficientes transportadores e sequestrantes de elétrons (MENTER e WILLIS, 1997). Entretanto, outras funções podem ser atribuídas a essas moléculas. Aparentemente, os microrganismos exploram as propriedades da piomelanina como vantagem competitiva. A piomelanina é um pigmento extracelular solúvel, mas pode adsorver à superfície celular e dessa forma pigmentar a célula. A estrutura química desses polímeros proporciona várias funções biológicas relacionadas com reações redox, como proteção contra a luz e o estresse oxidativo e até transdução de energia, uma vez que podem agir como intermediários na transferência de elétrons a aceptores terminais inorgânicos, sobretudo óxidos metálicos solúveis ou em fase sólida (TURICK *et al.*, 2003).



## 2.2.4 Turbomicinas

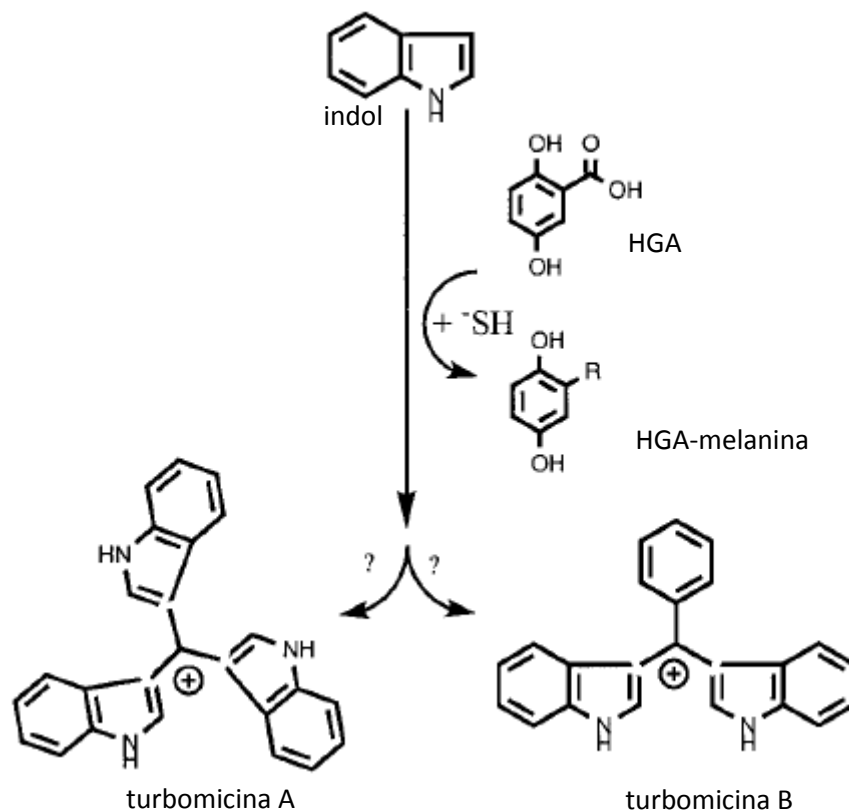
As turbomicinas (Figura 5) pertencem a uma classe de moléculas que tem sido estudada em função de seu potencial efeito antibiótico e citotóxico. A turbomicina A foi primeiro isolada como produto natural por BUDZIKIWICZ, ECKAU e EHRENBURG (1972) e a turbomicina B por GILLESPIE *et al.* (2002). O interesse recente nessas moléculas se deve principalmente ao fato de que elas foram obtidas, pela primeira vez, por abordagem metagenômica, e sua caracterização físico-química, elucidação de sua via de síntese e determinação de sua atividade biológica permanecem incompletas.

FIGURA 5 - FÓRMULAS ESTRUTURAIS DAS TURBOMICINAS A E B



GILLESPIE *et al.* (2002) observaram que as turbomicinas são geradas espontaneamente em paralelo ao processo de polimerização do homogentisato a piomelanina, na presença de indol. Como *E. coli*, a bactéria hospedeira do seu clone, secreta grandes quantidades de indol (SONNERWITH, 1980), a geração das turbomicinas parece ser dependente tanto do produto da ORF homólogo a 4-HPPD presente no clone como dos genes nativos de *E. coli* responsáveis pela produção e excreção de indol. Entretanto, os mecanismos dessa reação ainda não foram elucidados. A Figura 6 apresenta a via de síntese proposta.

FIGURA 6 - VIA DE SÍNTESE PROPOSTA PARA A GERAÇÃO DAS TURBOMICINAS



FONTE: GILLESPIE *et al.*, 2002.

As razões massa/carga calculadas para as turbomicinas A e B são de, respectivamente, 360,15006 e 321,13916.

#### 2.2.4.1 Atividades biológicas das turbomicinas

##### 2.2.4.1.1 Atividade antibiótica

GILLESPIE *et al.* (2002) fizeram a primeira caracterização da atividade antibiótica das turbomicinas, comparando a eficiência das moléculas purificadas a partir da cultura do clone metagenômico com a das moléculas sintetizadas quimicamente. A Tabela 1 mostra as estirpes de bactérias gram-positivas e gram-negativas e cepas de fungos testadas e a eficiência das turbomicinas A e B na inibição de seu crescimento. O efeito antibiótico foi determinado pela medição do

halo de inibição quando 2,5 µg de cada molécula foram aplicados em um ponto numa placa contendo o microrganismo semeado em meio sólido.

TABELA 1 - ATIVIDADE ANTIBIÓTICA DAS TURBOMICINAS A E B

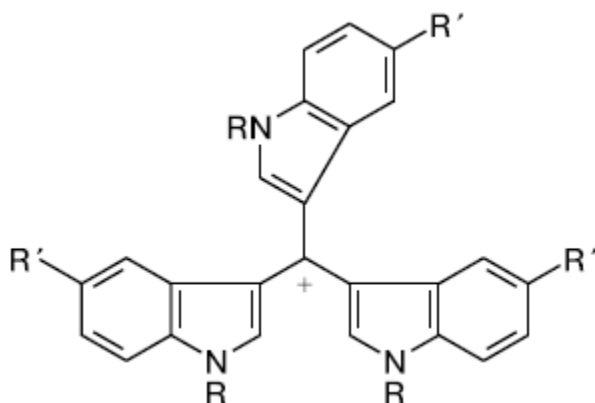
ORGANISMO OU ESTIRPE	INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO			
	Turbomicina A		Turbomicina B	
	Sintética	Natural	Sintética	Natural
Bactérias gram-negativas				
<i>Erwinia herbicola</i> IRQ	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> HS997	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9020	-	-	-	-
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium LT2	+	+	+	+
Bactérias gram-positivas				
<i>Bacillus cereus</i> subsp. <i>mycoides</i> 1003	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> BR151pPL608	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i> 4025	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> 3001	+	+	+	+
<i>Streptococcus pyogenes</i> 8P01	+	+	+	+
<i>Streptomyces griseus</i> 6501	+	+	+	+
Fungos ou protistas				
<i>Candida guilliermondii</i> Y001	+/-	+/-	+/-	+/-
<i>Pythium ultimum</i> 1033	-	-	-	-
<i>Fusarium solani</i> (f. sp. <i>glycine</i> ) 90.1	-	-	-	-

FONTE: GILLESPIE *et al.*, 2002.

NOTA: +, zona de 2 a 13 mm; +/-, zona de 1 mm; -, sem zona de inibição.

Uma vez que sais de tris(1-alkilindol-3-il)metílio são citotóxicos (LAVRENOV *et al.*, 2010), STEPANOVA *et al.* (2010) realizaram a síntese química de turbomicina A, cuja nomenclatura química é tris(indol-3-il)metílio, e vários derivados R e R' substituídos para avaliação da sua eficiência como agente antibiótico e citotóxico (Figura 7). A Tabela 2 mostra os resultados obtidos para a atividade antibacteriana e a Tabela 3, para a atividade antifúngica dessas moléculas.

FIGURA 7 - MOLÉCULAS DE TRIS(1-ALQUILINDOL-3-IL)METÍLIO SINTETIZADAS E TESTADAS



FONTE: STEPANOVA *et al.*, 2010.

LEGENDA: R = H (a), CH<sub>3</sub> (b), C<sub>2</sub>H<sub>5</sub> (c), n-C<sub>3</sub>H<sub>7</sub> (d), n-C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> (e), n-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub> (f), n-C<sub>6</sub>H<sub>13</sub> (g), benzil (h), n-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub> (i), n-C<sub>10</sub>H<sub>21</sub> (j), CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (k), sec-C<sub>4</sub>H (l), fenil (m); n-C<sub>5</sub>H<sub>11</sub> (n, o); R' = H (a-m), Br (n), OCH<sub>3</sub> (o).

TABELA 2 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DA TURBOMICINA A (1A) E DERIVADOS

COMPOSTO	MIC (µg mL <sup>-1</sup> )										
	Bactérias gram-positivas							Bactérias gram-negativas			
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 533	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> 602	<i>Staphylococcus aureus</i> 3797	<i>Staphylococcus aureus</i> 3798	<i>Enterococcus faecalis</i> 559	<i>Enterococcus faecalis</i> 560	<i>Enterococcus faecium</i> 569	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 3213	<i>Salmonella choleraesuis</i> no.
Controle	0,25	0,25	8,0	8,0	0,13	>64	>64	0,5	4,0	0,5	0,5
1a	4	4	4	-	4	4	4	>64	>64	>64	-
1b	2	2	2	1	8	8	8	-	-	-	>64
1c	0,5	1	1	-	2	4	2	>64	>64	>64	>64
1d	0,25	0,5	0,5	0,5	1	1	1	8	32	64	16
1e	0,25	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	4	4	4	8
1f	1	1	1	1	2	2	2	4	8	16	>64
1g	8	16	16	16	16	32	32	32	>64	>64	>64
1h	1	1	1	1	2	2	2	64	>64	>64	-
1j	>32	>32	>32	>32	-	-	-	-	-	-	-

FONTE: STEPANOVA *et al.*, 2010.

NOTA: MIC é a concentração inibitória mínima e o controle (positivo) é vancomicina para bactérias gram-positivas e gentamicina para bactérias gram-negativas. (-) denota sem inibição.

A turbomicina A (1a) apresenta efeito antibiótico para quase todas as cepas testadas, mas é possível observar que a substituição em R com radicais n-alquil tende a aumentar o efeito, apresentando seu máximo com o radical n-butil (1e).

TABELA 3 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DA TURBOMICINA A (1A) E DERIVADOS

COMPOSTO	MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			
	<i>Candida albicans</i> ATCC 14053	<i>Cryptococcus humicolus</i> ATCC 9949	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	<i>Fusarium oxysporum</i> VKM F-140
Controle	1	1	1	4
1a	>16	>16	>16	>16
1b	>16	>16	>16	>16
1c	4	>16	16	>16
1d	1	2	2	8
1e	1	2	1	2
1f	1	1	1	2
1g	2	2	2	4
1h	2	4	2	4
1j	>16	>16	>16	>16

FONTE: STEPANOVA *et al.*, 2010

NOTA: MIC é a menor concentração inibitória e C+ (controle positivo) é anfotericina b.

Da mesma forma que para os ensaios antibacterianos, o efeito antibiótico da turbomicina A aumenta com a n-alquilação em R, nesse caso apresentando máximo com a molécula n-pentil substituída (1f).

#### 2.2.4.1.2 Atividade antitumoral

STEPANOVA *et al.* (2010) também testaram a citotoxicidade da turbomicina A e derivados contra linhagens tumorais. Foram utilizadas as linhagens HCT116 (carcinoma intestinal), K562 e Jurkat (leucoses), Mel Kor (melanoma), SKOV-3 (câncer de ovário) e SK-BR-3 e MCF-7 (câncer de mama). Eles também utilizaram linhagens não tumorais para efeito comparativo: linfócitos de doadores saudáveis e a linhagem endotelial SVEC-4-10 dos vasos sanguíneos de ratos. Os resultados estão sumarizados na Tabela 4.

TABELA 4 - EFEITO CITOTÓXICO DA TURBOMICINA A (1A) E DERIVADOS

COMPOSTO	IC <sub>50</sub> (μmol L <sup>-1</sup> )								
	SVEC-4-10	Linfócitos de doadores	HCT116	K562	Jurkat	Mel Kor	SKOV-3	MCF-7	SK-BR-3
1a	-	-	2,30±0,20	1,60±0,40	-	-	-	-	-
1b	-	-	3,20±0,30	3,20±0,30	-	-	-	-	-
1c	>10	2,43±0,99	1,30±0,30	0,20±0,10	0,50±0,19	0,22±0,04	2,26±0,42	1,31±0,16	2,17±0,94
1d	>10	1,72±0,06	1,00±0,30	0,20±0,10	0,27±0,01	0,23±0,06	0,81±0,03	1,84±0,66	1,76±0,05
1e	0,37±0,00	0,94±0,25	0,30±0,10	0,09±0,04	0,22±0,03	0,07±0,01	0,25±0,04	0,65±0,25	0,26±0,12
1f	0,36±0,00	0,66±0,10	0,15±0,04	0,05±0,03	0,20±0,06	0,05±0,01	0,28±0,07	0,78±0,11	0,43±0,19
1g	0,76±0,03	1,64±0,00	0,30±0,10	0,07±0,03	0,49±0,01	0,61±0,18	3,81±2,64	>10	>10
1h	0,18±0,01	0,14±0,00	0,10±0,04	0,03±0,01	0,03±0,01	0,06±0,02	0,32±0,06	0,48±0,15	2,47±0,08
1i	0,64±0,14	2,97±0,00	1,00±0,20	0,20±0,04	1,13±0,14	0,42±0,07	4,11±2,18	4,66±1,12	6,39±1,85
1j	-	-	16,40±2,30	12,4±2,10	-	-	-	-	-
1k	-	-	<0,1	-	0,14±0,02	0,36±0,08	0,39±0,08	1,33±0,52	0,42±0,03
1l	>10	-	2,50±0,70	5,9±1,50	-	-	-	-	-
1m	1,60±0,0	-	-	-	-	0,51±0,13	0,88±0,29	3,24±0,25	0,87±0,02
1n	>10	-	7,30±2,00	-	-	>10	>10	>10	>10
1o	4,86±0,42	>10	0,80±0,20	0,15±0,03	>10	0,94±0,06	4,58±1,64	>10	>10

FONTE: STEPANOVA *et al.*, 2010.

NOTA: IC<sub>50</sub> é a concentração necessária para suprimir a proliferação em 50%. O erro padrão calculado é baseado em no mínimo 3 medições.

Observa-se que a citotoxicidade aumenta com o aumento do número de átomos de carbono no substituinte alquil não ramificado, dos derivados *N*-metil (1b) a *N*-butil (1e) e *N*-pentil (1f), em todas as linhagens. Os compostos 1e e 1f são, inclusive, menos tóxicos para as linhagens não tumorais do que para as tumorais, sugerindo que sua toxicidade é maior para células proliferativas, sendo por isso potenciais alvos de estudo como agentes antitumorais.

Uma vez que as turbomicinas apresentam atividade biológica, elas representam moléculas com potencial ainda não devidamente explorado. Em paralelo a esses estudos, é necessário otimizar sua produção, extração e purificação para a eventual produção em escala industrial.

#### 2.2.5 Biblioteca Metagenômica de Solo (GLOGAUER, 2011)

GLOGAUER (2011) partiu de uma amostra de solo contaminado com gordura animal, oriunda da margem da lagoa de tratamento de efluentes de uma indústria de processamento de carnes, para a construção de uma biblioteca metagenômica com insertos de aproximadamente 40 kb enriquecida para DNA procariótico, hospedada na estirpe *Escherichia coli* EPI300™. Em seguida, realizou a prospecção para atividade lipolítica e caracterizou uma nova lipase com alta atividade e ampla faixa físico-química de estabilidade e atividade.

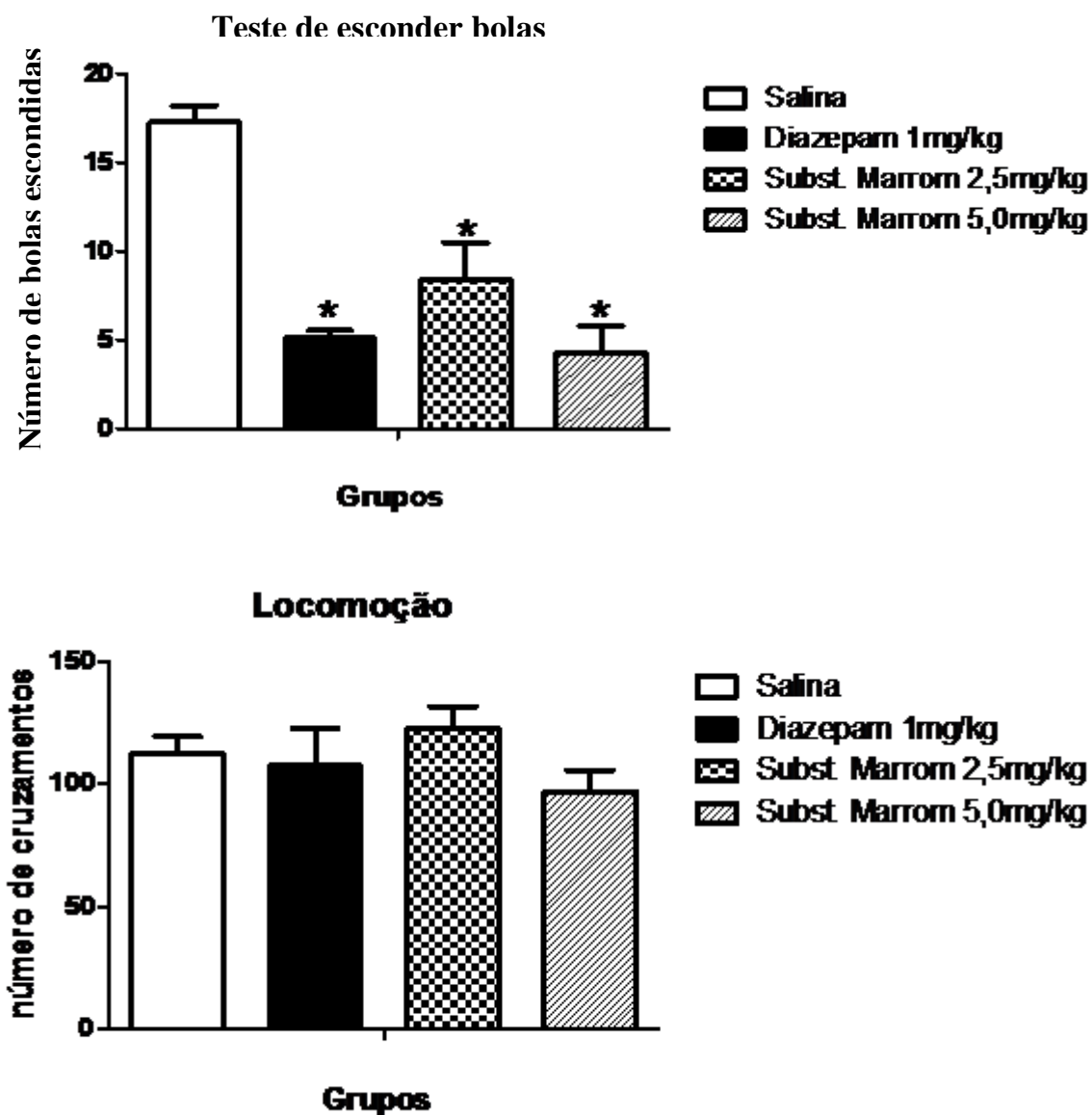
Essa biblioteca está sendo utilizada pelo Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná para bioprospecção de outras enzimas como proteases, quitinases e celulasas (trabalhos não publicados). Além disso, durante a prospecção lipolítica, foi possível verificar a presença de alguns clones com outros fenótipos diferenciados e facilmente detectáveis. Um desses clones, M01, produzia um halo marrom em meio sólido e provocava o escurecimento da cultura em meio líquido. Chamou a atenção o fato de que, aparentemente, o rendimento dessa produção era alto mesmo em condições não otimizadas de cultura, ou seja, nas condições padronizadas de cultura e manutenção da estirpe *E. coli* EPI300™.

O Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná testou o potencial do composto marrom bruto como agente ansiolítico (resultados não publicados). O Gráfico 2 apresenta os resultados obtidos de acordo com o teste de esconder bolas (NJUNGE e HANDLEY, 1991), onde a droga é administrada aos ratos e os mesmos são postos em gaiolas com a presença de cama e determinado número de bolas. Os animais apresentam compulsão natural por enterrar as bolas na cama. A redução no número de bolas escondidas sem redução no número de cruzamentos na gaiola indica efeito ansiolítico. O composto marrom foi aplicado intraperitonalmente em ratos, nas concentrações de 2,5 e 5,0 mg/kg, e o efeito foi comparado com salina (controle negativo) e diazepam, agente ansiolítico clássico (controle positivo). Ambas as concentrações apresentaram efeito ansiolítico, sendo a maior delas comparável ao efeito causado por diazepam.

O presente trabalho trata da caracterização genética do clone M01 e da caracterização físico-química do composto marrom produzido por ele.



GRÁFICO 2 - EFEITO DO COMPOSTO MARROM COMO POTENCIAL AGENTE ANSIOLÍTICO



FONTE: Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná (2011).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO PRINCIPAL**

Identificar o(s) gene(s) responsável(is) pela síntese do composto marrom e caracterizar esse composto.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Sequenciar o inserto do fosmídeo do clone M01.
- Determinar a provável via de síntese do composto marrom.
- Isolar e caracterizar o composto marrom.
- Determinar as propriedades físico-químicas do composto marrom.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ESTIRPES DE MICRORGANISMOS E VETORES

O foscímideo original do clone M01, denominado pM01, da biblioteca de GLOGAUER *et al.* (2011), possui o vetor fosmidial pCC2FOS e está hospedado na estirpe *Escherichia coli* EPI300™-T1<sup>R</sup> (CopyControl Fosmid Library Production Kit, Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, EUA). A estirpe *E. coli* DH10B (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) foi utilizada na construção das sub-bibliotecas e para retransformação do foscímideo em estirpe isogênica aos subclones. As etapas de subclonagem foram realizadas com o vetor pGEM®-3Zf(+) (Promega Corporation, Madison, WI, EUA).

Nos ensaios microbiológicos para determinação dos antibiogramas, foram utilizadas as estirpes *Aeromonas hydrophyla* ATCC 7966, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* (isolado clínico), *Proteus mirabilis* (isolado clínico), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella enterica* ATCC BAA 664 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

A Tabela 5, a Tabela 6 e a Tabela 7 apresentam as descrições das estirpes de microrganismos, dos vetores e dos foscímdeos e plasmímdeos utilizados, respectivamente.

TABELA 5 – ESTIRPES DE MICRORGANISMOS

continua		
ESTIRPE	FENÓTIPO E/OU GENÓTIPO	REFERÊNCIA
Biologia Molecular DH10B™	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 endA1$ <i>araD139</i> $\Delta(ara, leu)7697 galU galK \lambda^-$ <i>rpsL nupG</i> / pMON14272 / pMON7124 (Sm <sup>R</sup> )	Invitrogen Life Technologies
EPI300™-T1 <sup>R</sup>	F- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ (Str <sup>R</sup> ) $\phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1endA1$ <i>araD139</i> $\Delta(ara, leu)7697 galU galK \lambda^-$ <i>rpsL nupG trfA tonA dhfr</i>	Epicentre Biotechnologies

conclusão

ESTIRPE	FENÓTIPO E/OU GENÓTIPO	REFERÊNCIA
Ensaios microbiológicos		
<i>Aeromonas hydrophyla</i> ATCC 7966	Genótipo original	American Type Culture Collection (ATCC)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Genótipo original	American Type Culture Collection (ATCC)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Genótipo original	American Type Culture Collection (ATCC)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Genótipo original	Laboratório de Bacteriologia Clínica, Departamento de Patologia Médica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná
<i>Proteus mirabilis</i>	Genótipo original	Laboratório de Bacteriologia Clínica, Departamento de Patologia Médica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Genótipo original	American Type Culture Collection (ATCC)
<i>Salmonella enterica</i> ATCC BAA 664	Genótipo original	American Type Culture Collection (ATCC)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Genótipo original	American Type Culture Collection (ATCC)

TABELA 6 – VETORES

VETOR	FENÓTIPO E/OU GENÓTIPO	REFERÊNCIA
pCC2FOS	<i>lacZ</i> , sítio Cos, <i>OriV</i> , <i>Ori2</i> , Cm <sup>R</sup>	Epicentre Biotechnologies
pGEM <sup>®</sup> -3Zf(+)	f1ori, <i>lacZ</i> , Promotores SP6 e T7, Amp <sup>R</sup>	Promega Corporation

TABELA 7 – FOSMÍDEOS E PLASMÍDEOS

FOSMÍDEO/PLASMÍDEO	FENÓTIPO E/OU GENÓTIPO	REFERÊNCIA
pM01	Clone em pCC2FOS contendo fragmento de DNA purificado da amostra de solo	GLOGAUER, 2011
pX.YZ	Clone em pGEM <sup>®</sup> -3Zf(+) contendo fragmento do fosmídeo pM01	Este trabalho

LEGENDA: X = número da placa/bloco; Y = tipo da sub-biblioteca (3kb, 5kb ou 8kb para as sub-bibliotecas de fragmento de nebulização de 3 kb, 5 kb ou 8 kb, respectivamente; *Eco*, *Pst* ou *Xba* para as sub-bibliotecas de fragmentos de restrição de *EcoRI*, *PstI* e *XbaI* respectivamente); Z = número sequencial do clone.

## 4.2 MATERIAL GERAL

### 4.2.1 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo utilizados foram preparados segundo SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS (1989).

#### Meio Luria Bertani (LB)

- Triptona 10 g/L
- Extrato de levedura 5 g/L
- NaCl 10 g/L

O meio LB ágar (LA) foi obtido pela adição de 15 g/L de ágar ao meio LB.

#### Meio Mínimo (M9)

- M9 salts 5X ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  64 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  15 g/L, NaCl 2,5 g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  5g/L) 200 mL/L
- $\text{MgSO}_4$  2 mmol/L
- Glucose 0,4%
- $\text{CaCl}_2$  0,01 mmol/L
- Extrato de levedura 1 g/L

#### Meio SOB

- Triptona 20 g/L
- Extrato de levedura 5 g/L
- NaCl 0,584 g/L
- KCl 0,186 g/L

#### Meio SOC

- Triptona 20 g/L

- Extrato de levedura 5 g/L
- NaCl 0,6 g/L
- KCl 0,19 g/L
- MgCl<sub>2</sub> 0,94 g/L
- MgSO<sub>4</sub> 1,2 g/L
- Glucose 3,6 g/L

#### Meio Terrific Broth (TB)

- Triptona 12 g/L
- Extrato de levedura 24 g/L
- Glicerol 4 mL/L

#### 4.2.2 Antibióticos

Os antibióticos utilizados nas etapas de cultivo, manutenção e seleção das estirpes de *E. coli* foram: ampicilina 250 µg/mL (Amp<sup>250</sup>), cloranfenicol 15 µg/mL (Cm<sup>15</sup>), estreptomicina 80 µg/mL (Sm<sup>80</sup>) e tetraciclina 10 µg/mL (Tc<sup>10</sup>).

### 4.3 SEQUENCIAMENTO DO FOSMÍDEO pM01

#### 4.3.1 Manipulação de DNA

Os procedimentos de eletroforese de DNA em gel de agarose foram realizados de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989). A concentração de agarose adotada foi de 0,8% e, sempre que necessário, foi adicionado um marcador de peso molecular.

As reações de restrição e ligação foram realizadas conforme orientação do fabricante dos kits/enzimas.

Para a reação de inserção de transposon foi utilizado o kit *EZ::TN<sup>TM</sup> <TET-I> Insertion Kit* (Epicentre) e seguido o protocolo conforme fabricante.

#### 4.3.2 Extração e Purificação de DNA Fosmidial e Plasmidial

Os procedimentos para extração e purificação de DNA fosmidial e plasmidial foram realizados por lise alcalina, de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989). Para extração do DNA fosmidial, o meio de cultura foi suplementado com L-arabinose a 0,001% para indução do número de cópias do fósmeo (WILD, HRADECNA e SZYBALSKY, 2002).

Para purificação de DNA plasmidial em larga escala, um bloco de 96 poços foi preenchido com 1 mL de meio Terrific Broth contendo o antibiótico apropriado em cada poço e inoculado com o auxílio de um replicador, a partir de uma placa com as colônias mantidas em meio sólido. A placa foi selada com adesivo e sobre cada poço foram feitos dois furos para aeração, sendo então incubada a 37°C, 180 rpm, durante 22 horas. Após o crescimento, o bloco foi centrifugado a 4000 rpm durante 7 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Os pellets de células foram ressuspensos em misturador tipo vortex com 180 µL de GET (glucose 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM) por poço, com a placa selada com adesivo. A placa foi centrifugada a 4000 rpm durante 7 minutos, o sobrenadante foi descartado e a placa foi deixada invertida em papel absorvente para retirar o excesso de líquido. Os pellets foram novamente ressuspensos em misturador vortex com 80 µL de GET contendo 2,5 µL de RNase (10 mg/mL) por poço. Foram transferidos 80 µL da suspensão de células de cada poço para a microplaca de polipropileno com capacidade para 250 µL e fundo redondo. A cada poço foi adicionado 80 µL de solução de lise (NaOH 0,2 M, SDS 1%), a placa foi selada com adesivo, misturada 30 vezes por inversão, incubada durante 5 minutos em temperatura ambiente e centrifugada rapidamente para eliminar os resíduos líquidos do adesivo. A cada poço foi então adicionado 80 µL de acetato de potássio 3 M a 4°C, a placa foi selada com adesivo, misturada 30 vezes por inversão, incubada durante 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugada até 4000 rpm para eliminar os resíduos líquidos do adesivo. O adesivo foi retirado e a placa foi incubada em estufa a 90°C por exatos 30 minutos. A placa foi novamente selada, incubada em gelo por 10 minutos, centrifugada a 4000 rpm e 4°C por 10 minutos. Uma placa filtro de 96 poços (Millipore, Billerica, MA, EUA) foi

fixada com fita adesiva sobre uma microplaca de fundo em V de polipropileno com capacidade para 250  $\mu$ L. O sobrenadante da placa de fundo redondo foi transferido para a placa filtro e centrifugada a 4000 rpm por 5 minutos. A placa filtro foi retirada e a cada poço da placa de fundo em V foi adicionado 0,6 volumes de isopropanol. Essa placa foi selada com adesivo, misturada 30 vezes por inversão e centrifugada a 4000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa foi mantida invertida sobre papel absorvente para retirar o excesso de líquido. A cada poço foi adicionado 150  $\mu$ L de etanol 70% e a placa foi centrifugada a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e a placa foi novamente mantida invertida sobre papel absorvente. Por fim, a placa foi deixada secar a temperatura ambiente por aproximadamente 60 minutos, e o DNA precipitado e seco foi ressuspensão com 30  $\mu$ L de água ultrapura por poço.

#### 4.3.3 Fragmentação, Reparo e Fosforilação de DNA Fosmidial por Nebulização

O DNA fosmidial foi nebulizado para obtenção de fragmentos aleatórios de DNA de tamanho entre 8 e 3 kb. Para tanto, cerca de 10  $\mu$ g de DNA fosmidial purificado foi adicionado a uma cubeta de nebulização contendo 600  $\mu$ L de glicerol 50%, 100  $\mu$ L de acetato de sódio 3 M e água ultrapura para um sistema de 1000  $\mu$ L. A nebulização foi realizada com gás nitrogênio a 100 kPa durante 3 segundos. Após a nebulização, o sistema foi incubado durante 10 minutos com volume igual de isopropanol para precipitação do DNA fragmentado e, na sequência, centrifugado durante 30 minutos a 17000 g. O sobrenadante foi descartado, o precipitado foi lavado duas vezes com etanol 70%, seco e ressuspensão em 32  $\mu$ L de água ultrapura.

Como a fragmentação do DNA por nebulização é aleatória, é necessário o reparo das extremidades para que se tornem cegas e fosforiladas na ponta 5', de forma que os fragmentos estejam prontos para a subsequente ligação a um vetor de clonagem. O sistema de reparo é composto de 31  $\mu$ L da solução de DNA nebulizado, 4  $\mu$ L de tampão de reação REact 2 10X (Invitrogen), 1  $\mu$ L de dNTP 5 mM, 1  $\mu$ L de ATP 100 mM, 10 U da enzima T4 polinucleotídeo quinase (Fermentas), 5 U de T4 DNA polimerase (Invitrogen) e 10 U de fragmento Klenow (Fermentas). A reação de reparo é realizada



em termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* com o seguinte ciclo: 12°C por 40 minutos, 37°C por 45 minutos e 75°C por 10 minutos.

#### 4.3.4 Seleção e Purificação de Fragmentos para Construção das Sub-bibliotecas de Fragmentos de Nebulização

Após o reparo e fosforilação dos fragmentos de DNA nebulizado, o DNA produto dessa reação foi misturado com glicerol 100% e corante FSUDS (azul de bromofenol 0,04%, xileno cianol 0,04%, glicerol 5%) na proporção volumétrica de 4:2:1 e aplicado em um gel de agarose de baixo ponto de fusão preparado a 1% em tampão TBE 1X (89 mM de Tris-base, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA). A corrida de eletroforese foi conduzida por 14 horas a 12 V em tampão TBE 1X. A faixa do gel correspondente ao marcador de peso molecular *1 kb gene ruler* (Fermentas) foi excisada e corada com brometo de etídio, atuando como guia para a seleção do tamanho dos fragmentos de interesse. As bandas correspondentes a 8, 5 e 3 kb foram cortadas do gel com o auxílio de um bisturi, transferidas para um tubo e fundidas a 56°C durante 10 minutos. Na sequência foi adicionado ao tubo um mínimo de 3 volumes de guanidina HCl 6 M, a mistura foi homogeneizada em misturador vortex e incubada a 56°C durante 10 minutos, passando pelo vortex ocasionalmente. Então foram adicionados 10 µL de solução aquosa de sílica em pó 50%, a solução foi homogeneizada em vortex e incubada a 56°C durante 5 minutos, passando pelo vortex ocasionalmente. O tubo foi então centrifugado a 17000 g durante 15 segundos e o sobrenadante foi descartado. O pellet de sílica foi ressuspenso em 500 µL de guanidina HCl 6 M e o tubo foi incubado a 56°C durante 1 minuto, sendo depois centrifugado a 17000 g durante 15 segundos, e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 80% a 4-10°C. O restante de etanol que sobrou no tubo foi retirado com o auxílio de uma pipeta. O pellet foi deixado secar ligeiramente em temperatura ambiente, tomando cuidado para não ressecar. Então foi adicionado ao tubo 20 µL de água ultrapura, a solução foi homogeneizada em vortex e incubada a 56°C durante 10 minutos, passando pelo vortex

ocasionalmente. O tubo foi centrifugado durante 30 segundos e o sobrenadante, correspondente à solução de DNA purificado, foi transferido para tubo novo.

#### 4.3.5 Reações de Restrição do DNA Fosmidial e dos Vetores de Clonagem

O DNA fosmidial foi digerido com as enzimas *EcoRI*, *PstI* e *XbaI* para construção das sub-bibliotecas de restrição. Os vetores de clonagem foram digeridos com as enzimas *EcoRI*, *PstI* e *XbaI* (gerando extremidades coesivas) para ligação dos fragmentos de restrição e *HincII* (extremidades cegas) para ligação dos fragmentos de nebulização. Após a restrição dos vetores, foi realizada a defosforilação da ponta 3' incubando o sistema com 1 µL da enzima SAP (*shrimp alkaline phosphatase*, Fermentas) a 37°C por 1 hora.

#### 4.3.6 Preparo de Células Eletrocompetentes e Transformação

Células eletrocompetentes foram preparadas e transformadas com as ligações de fragmentos de nebulização e restrição de acordo com SAMBROOK *et al.* (1989). Após transformação, as alíquotas submetidas à eletroporação foram plaqueadas em placa de LB ágar Amp<sup>250</sup> X-gal<sup>40</sup> (5-bromo-4-cloro-indolil-β-D-galactopiranosídeo 40 µg/mL). Os transformantes contendo inserto foram selecionados através do princípio da α-complementação, onde as colônias brancas possuem vetor com inserto.

#### 4.3.7 Montagem e Manutenção das Sub-bibliotecas

A montagem das sub-bibliotecas de fragmentos de nebulização e de restrição foi realizada através da coleta manual das colônias contendo inserto (colônias brancas). Essas colônias foram transferidas para uma placa de LB ágar Amp<sup>250</sup> com 96 posições. Após o crescimento em meio sólido, as bactérias foram inoculadas em placa do tipo ELISA de 96 poços contendo 100 µL de LB Amp<sup>250</sup> e incubadas durante a noite em

estufa a 37°C. No dia seguinte foi adicionado 100 µL de glicerol 50% estéril a cada poço. As placas foram seladas com adesivo plástico e mantidas em congelador a -20°C.

#### 4.3.8 Confirmação da Presença de Inserto

A presença de inserto nos transformantes foi confirmada através da extração do DNA plasmidial (item 4.3.1) e comparação de tamanho do plasmídeo com o vetor de clonagem pGEM®-3Zf(+) através de eletroforese de DNA em gel de agarose (item 4.3.2). Os transformantes contendo inserto foram denominados subclones e nomeados no formato X.YZ, sendo X o número da placa correspondente, Y o tipo de sub-biblioteca (3kb, 5kb e 8kb para as sub-bibliotecas de fragmentos de nebulização de 3 kb, 5 kb e 8 kb respectivamente; e *Eco*, *Pst* e *Xba* para as sub-bibliotecas de fragmentos de restrição pelas enzimas *Eco*RI, *Pst*I e *Xba*I, respectivamente) e Z o número do subclone.

#### 4.3.9 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação de cadeia (SANGER, NICKLEN e COULSON, 1977) em sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação de sequenciamento de uma das pontas do inserto do fosmídeo (clone) ou dos plasmídeos (subclones) foi realizada com o kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), usando-se aproximadamente 350 ng de DNA alvo dupla fita, conforme protocolo do fabricante. Os iniciadores utilizados e suas respectivas temperaturas de anelamento foram: *pCC2™ forward sequencing primer* e *pCC2™ reverse sequencing primer* (Epicentre) para o clone (60°C) e *pUC/M13 forward primer* e *pUC/M13 reverse primer* (Promega) para os subclones (55°C). Após a reação, o volume foi corrigido para 20 µL com água ultrapura, adicionando-se 2 µL de acetato de amônio 7,5 M seguido de homogeneização, 65 µL de etanol e nova homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 17000 g durante 20 minutos, lavadas duas vezes com etanol 70% e secas em temperatura ambiente.

## 4.4 BIOINFORMÁTICA

### 4.4.1 Montagem das Leituras Obtidas em Contigs e Scaffolds

As leituras obtidas para cada corrida de sequenciamento foram montadas utilizando os programas Phred e Phrap (EWING e GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998), sendo usado como parâmetro de qualidade mínimo Phred 20, e os resultados obtidos foram visualizados através do programa Consed (GORDON, ABAJIAN e GREEN, 1998).

### 4.4.2 Anotação dos Contigs

Prováveis ORFs foram identificadas utilizando o programa *Artemis* v14.0.0. (RUTHERFORD *et al.*, 2000) e as sequências de aminoácidos das ORFs encontradas foram comparadas com as sequências de proteínas não redundantes (nr) depositadas no banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a ferramenta *blastp* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>, ALTSCHUL *et al.*, 1997). Foram consideradas ORFs verdadeiras aquelas que codificam para proteínas homólogas cujo valor esperado (*E-value*) era menor que 1E-18.

### 4.4.3 Construção das Árvores Taxonômicas

As árvores taxonômicas foram construídas utilizando o programa MEGA 5.10 (TAMURA *et al.*, 2011) pelo método *neighbor-joining*, usando o teste de filogenia *bootstrap* com valor 1000.

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO MARROM

### 4.5.1 Produção e Extração do Composto Marrom em Larga Escala

Para produção do composto marrom, o subclone 8.5kb13 foi inoculado em LB Amp<sup>250</sup> e incubado a 37°C sob rotação de 180 rpm, durante 16 horas (pré-inóculo). Na sequência, 4 frascos erlenmeyer com capacidade para 2 L cada, contendo 500 mL de LB Amp<sup>250</sup>, foram inoculados com 1% do pré-inóculo cada, e cultivados em shaker a 30°C durante 3,5 dias. No final do período, o meio de cultura se apresenta com coloração marrom escura saturada.

A extração do composto marrom foi feita baseada no protocolo estabelecido por GILLESPIE *et al.* (2002). O meio de cultura saturado com composto marrom foi centrifugado 2 vezes a 5000 g e 10°C durante 10 minutos para remoção das células. O sobrenadante teve o pH ajustado para 13,0 com solução de NaOH, sendo mantido sob agitação durante 1 hora. Na sequência o pH foi ajustado para 2,0 com solução de HCl, sendo novamente mantido sob agitação durante 1 hora e então deixado decantar na geladeira (4°C) durante a noite. No dia seguinte, toda a solução foi centrifugada a 5000 g e 10°C durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado duas vezes com água destilada pH 2,0, novamente centrifugada a 5000 rpm e 10°C durante 15 minutos. O pellet foi seco em temperatura ambiente, pesado e ressuspenso em clorofórmio:metanol 80:20 na concentração final de 10 mg/mL, para posterior extração e fracionamento.

O composto marrom bruto foi analisado por espectrometria de massa (Q-TOF e MALDI-TOF) e cromatografia de camada delgada (TLC). Para tanto, foi ressuspenso a 1 mg/mL em metanol.

Para Q-TOF, os espectros de massa foram obtidos em um espectrômetro de massa MICROTOF-Q II™ (Bruker Daltonics, Billerica, EUA), equipado com uma fonte de ionização do tipo eletrospray ortogonal (ESI). Os espectros foram obtidos em modo iônico positivo na faixa de massa/carga 50 – 1000. A voltagem capilar foi mantida em -4500 V e a voltagem na placa final foi mantida em -500 V. O fluxo gasoso para o

nebulizador foi mantido a uma pressão de 0,4 bar enquanto que o fluxo do gás de secagem foi mantido a 4 L/min a 180°C. A amostra foi injetada na fonte ESI for infusão direta a uma taxa de 6 µL/min. O instrumento foi calibrado externamente usando método de calibração quadrática melhorado com uma mistura de aglomerados de formato de sódio compreendendo íons na faixa de massa/carga 90,976 a 1382,737.

Para MALDI-TOF, 1 µL da amostra foi misturado com 1 µL de matriz Super-DHB (90% ácido 2,5-gentísico e 10% ácido 2-hidróxi-5-metóxi-benzóico) e aplicado diretamente na placa de análise. As relações massa/carga foram determinadas utilizando um espectrômetro de massa MALDI-TOF/MS modelo Autoflex II (Bruker Daltonics). O programa utilizado foi *FlexControl* 2.0 (Bruker Daltonics). Os espectros foram obtidos no modo refletor positivo, com uma voltagem de aceleração de 20 kV, intervalo de 150 ns entre o pulso de laser e aplicação da voltagem, e faixa de aquisição entre 0 – 800 Da. A calibração externa foi feita utilizando padrões de peptídeos de massa conhecida (angiotensina, substância P, bombesina, ACTH e somatostatina) e como calibrante interno foram utilizados picos de autólise da tripsina (842,50 Da e 2211,10 Da) quando presentes. A análise e tratamento dos espectros foi feita utilizando o programa *FlexAnalysis* 2.0 (Bruker Daltonics). Os picos monoisotópicos foram detectados utilizando-se o algoritmo SNAP e relação sinal/ruído igual a 6.

Para TLC, utilizou-se como suporte uma placa de sílica da marca Fluka (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) e cada fração foi aplicada com ponteira em um spot de 5 µL a 1 cm da parte inferior da placa, distanciados 1 cm entre si e das extremidades laterais. A placa foi resolvida em cuba de vidro vedada, saturada com a fase móvel, clorofórmio:metanol:ácido acético 80:20:0,2.

#### 4.5.2 Fracionamento do Composto Marrom

O fracionamento do composto marrom foi feito baseado no protocolo estabelecido por HANDELSMAN *et al.* (2011), sendo dividido em três etapas.

Na primeira etapa, o composto marrom ressuspenso em clorofórmio:metanol 80:20 foi passado através de um *plug* de sílica em pó para remoção do material insolúvel.

Na sequência, o filtrado foi adicionado a um tubo contendo 33 mg de sílica em pó equilibrada com clorofórmio:metanol:ácido acético 95:5:0,2 para cada mg inicial de composto marrom. O tubo foi homogeneizado, deixado descansar para sedimentação da sílica (aproximadamente 1 minuto) e o sobrenadante foi passado para novo tubo contendo a mesma quantidade de sílica em pó, novamente homogeneizado e deixado descansar. O sobrenadante do segundo tubo foi transferido para novo tubo, e essa solução foi denominada de “composto marrom fase 1”. Na sequência, ambos os tubos contendo sílica foram lavados 2 vezes com clorofórmio:metanol :ácido acético 80:20:0,2 e os sobrenadantes foram reunidos no tubo contendo o composto marrom fase 1. Essa solução foi deixada secar em temperatura ambiente, sendo então ressuspensa em 1 mL de clorofórmio:metanol:triethylamina 80:20:0,1 para cada mg inicial de composto marrom.

Na segunda etapa, que corresponde a uma cromatografia de fase normal, 5 mL dessa solução foram carregados em uma coluna de 30 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, empacotada com 75 mL de sílica equilibrada com clorofórmio:metanol:triethylamina 95:5:0,1 e os eluentes utilizados correspondiam a alíquotas de 10 mL dos solventes 1-21 seriados conforme Tabela 8.

As frações eluídas começaram a ser coletadas concomitantemente à adição do solvente 4, sendo separadas em 10 alíquotas de 20 mL cada. As 10 frações eluídas foram secas em temperatura ambiente e ressuspensas em 1 mL de clorofórmio:metanol 80:20. As frações 2 e 3, de coloração avermelhada, foram reunidas e denominadas como composto vermelho, e as frações 5 a 10, de coloração alaranjada, foram reunidas e denominadas de composto laranja.

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO EM RAZÃO VOLUMÉTRICA DOS SOLVENTES SERIADOS USADOS COMO ELUENTE NA PURIFICAÇÃO DAS TURBOMICINAS

#	CLOROFÓRMIO:METANOL: TRIETILAMINA 95:5:0,1	CLOROFÓRMIO:METANOL: TRIETILAMINA 90:10:0,1	CLOROFÓRMIO:METANOL: TRIETILAMINA 80:20:0,1
1	10	-	-
2	9	1	-
3	8	2	-
4	7	3	-
5	6	4	-
6	5	5	-
7	4	6	-
8	3	7	-
9	2	8	-
10	1	9	-
11	-	10	-
12	-	9	1
13	-	8	2
14	-	7	3
15	-	6	4
16	-	5	5
17	-	4	6
18	-	3	7
19	-	2	8
20	-	1	9
21	-	-	10

FONTE: AUTOR, 2012.

Na terceira etapa, outra cromatografia de fase normal, a fração contendo o composto vermelho foi carregada em uma coluna de 30 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, empacotada com 75 mL de sílica em pó equilibrada com clorofórmio:metanol:ácido acético 85:15:0,2, e a fase móvel era a mesma mistura. As frações eluídas começaram a ser coletadas no momento em que o composto vermelho estava alcançando o final da coluna, sendo separadas em alíquotas de 1 mL cada. As frações 1-3 foram reunidas e denominadas de TbB (turbomicina B). Em paralelo, a fração contendo o composto laranja foi carregada em uma coluna com as mesmas características, equilibrada com clorofórmio:metanol:ácido acético 93:7:0,2, e a fase móvel correspondia a um gradiente de clorofórmio:metanol:ácido acético nas concentrações 93:7:0,2 e 86:14:0,2. As frações eluídas começaram a ser coletadas no momento em que o composto laranja estava alcançando o final da coluna, sendo separadas em alíquotas de 1 mL cada. As frações 1-3 foram reunidas e denominadas de TbA (turbomicina A).



A verificação do grau de purificação de todas as frações obtidas foi realizada por cromatografia em camada delgada (TLC) e espectrometria de massa (MALDI-TOF), conforme descrito no item 4.5.1.

#### 4.5.3 Ensaio para Efeito Antibiótico

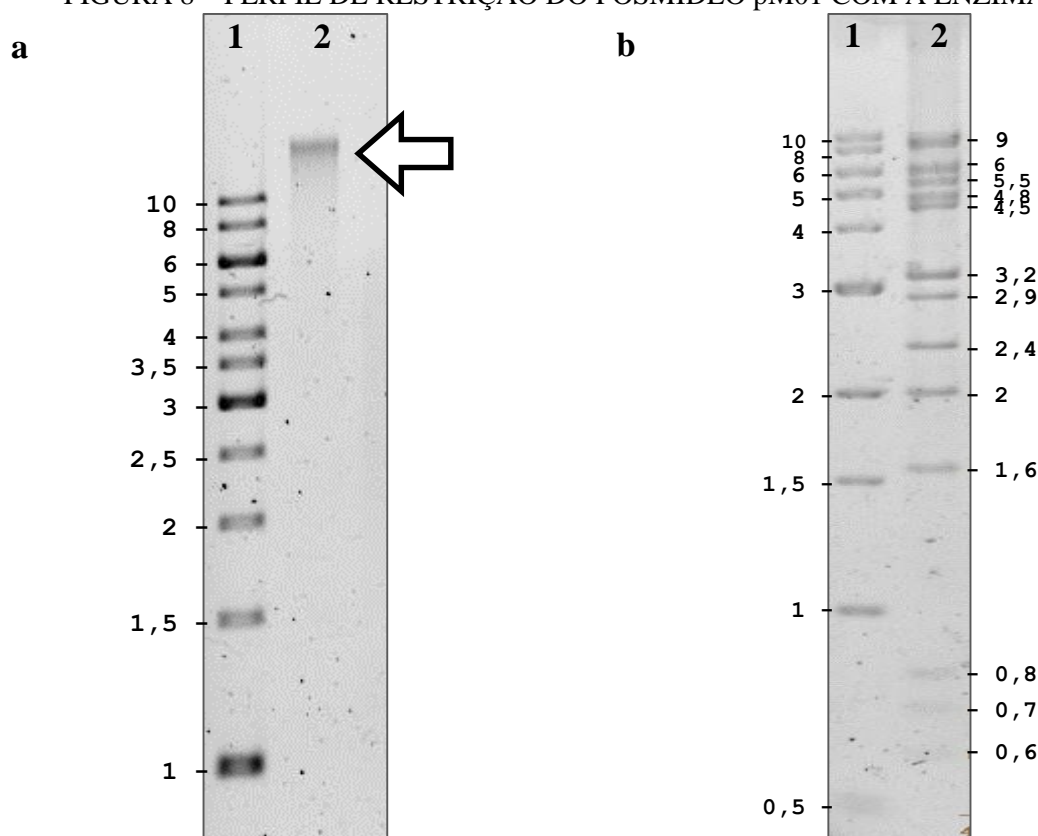
O ensaio para efeito antibiótico foi realizado com base em GILLESPIE *et al.* (2002). As estirpes patogênicas testadas (Tabela 5) foram plaqueadas em ágar Mueller-Hinton (Laborclin, Curitiba, Brasil) de acordo com o método Kirby-Bauer (BAUER *et al.*, 1966). Soluções em clorofórmio:metanol 80:20 das moléculas a serem testadas foram aplicadas como gotas de 10 µL sobre discos de papel filtro estéril, para as quantidades finais de 10, 100 e 1000 µg. Após a secagem do solvente, os discos foram depositados em diferentes quadrantes das placas inoculadas. As placas foram incubadas a 4°C durante cerca de 12 horas, sendo na sequência incubadas em estufa a 36°C durante 16 horas. O efeito antibiótico foi determinado pelo tamanho do halo de inibição de crescimento ao redor dos discos. O controle negativo utilizado foi um disco de papel filtro embebido em 10 µL do solvente, após secagem, e o controle positivo foi um disco contendo 30 µg de ceftriaxona.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PREDIÇÃO DO TAMANHO DO INSERTO DO FOSMÍDEO pM01

Para predição do tamanho do inserto do fósídeo pM01, o fósídeo purificado foi submetido a digestão com a enzima de restrição *EcoRI*. A Figura 8a mostra o resultado de eletroforese de DNA em gel de agarose evidenciando a presença do fósídeo após protocolo de purificação; a Figura 8b mostra o perfil de restrição com a enzima utilizada. A soma dos tamanhos aproximados para as bandas do fósídeo digerido é de 44 kb; subtraindo-se 8 kb do vetor pCC2FOS, se sugere um inserto de aproximadamente 36 kb.

FIGURA 8 – PERFIL DE RESTRIÇÃO DO FOSMÍDEO pM01 COM A ENZIMA *EcoRI*



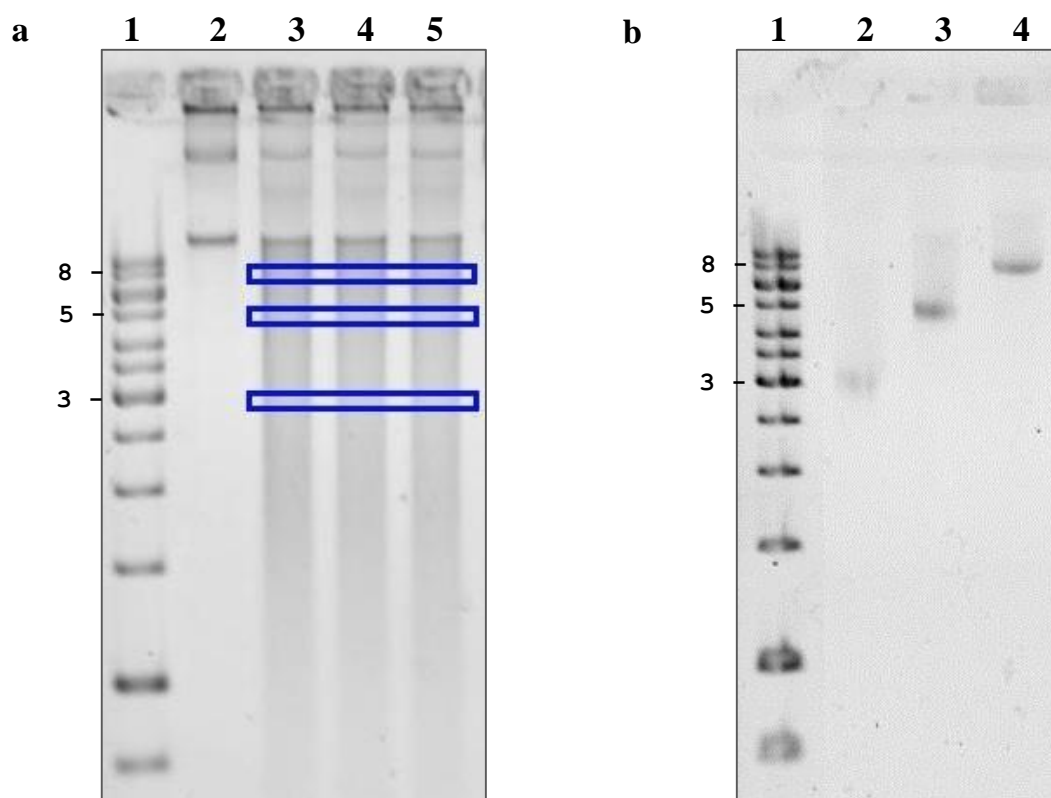
FONTE: AUTOR, 2012.

LEGENDA: Eletroforese de DNA em gel de agarose 0,8% mostrando na linha 1 o marcador de peso molecular e na linha 2: a) o fósídeo pM01 após purificação e b) o perfil de restrição do fósídeo com a enzima de restrição *EcoRI*.

## 5.2 CONSTRUÇÃO E SEQUENCIAMENTO DAS SUB-BIBLIOTECAS

Após nebulização, o fosmídeo pM01 fragmentado foi separado por eletroforese em gel de agarose e as bandas correspondentes às faixas de 3, 5 e 8 kb foram cortadas, recuperadas e purificadas. A Figura 9a mostra o resultado de eletroforese de DNA em gel de agarose de três alíquotas do fosmídeo nebulizado e as faixas correspondentes à excisão; a Figura 9b mostra as bandas correspondentes a 3, 5 e 8 kb após purificação.

FIGURA 9 – PERFIL DE NEBULIZAÇÃO DO FOSMÍDEO pM01

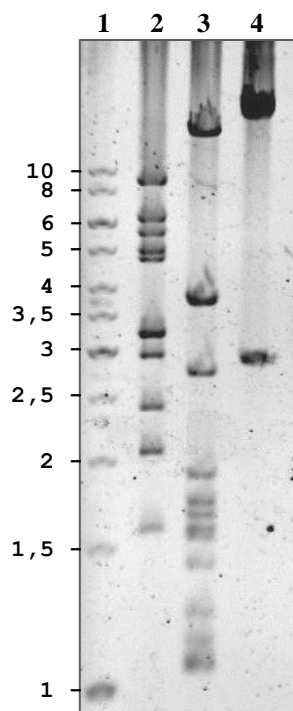


FONTE: AUTOR, 2012.

LEGENDA: Eletroforese de DNA em gel de agarose 0,8% mostrando na linha 1 o marcador de peso molecular e: a) na linha 2 o fosmídeo pM01 e nas linhas 3-5, o fosmídeo nebulizado, com destaque para as faixas do gel que foram excisadas para purificação do DNA correspondente aos tamanhos de 3, 5 e 8 kb; b) nas linhas 2, 3 e 4 os fragmentos purificados de 3, 5 e 8 kb, respectivamente.

Após digestão do fosmídeo pM01 com as enzimas de restrição *EcoRI*, *PstI* e *XbaI*, o perfil dessas restrições foi verificado através de eletroforese em gel de agarose. A Figura 10 mostra os perfis de restrição obtidos.

FIGURA 10 – PERFIL DE RESTRIÇÃO DO FOSMÍDEO pM01 COM AS ENZIMAS *EcoRI*, *PstI* E *XbaI*

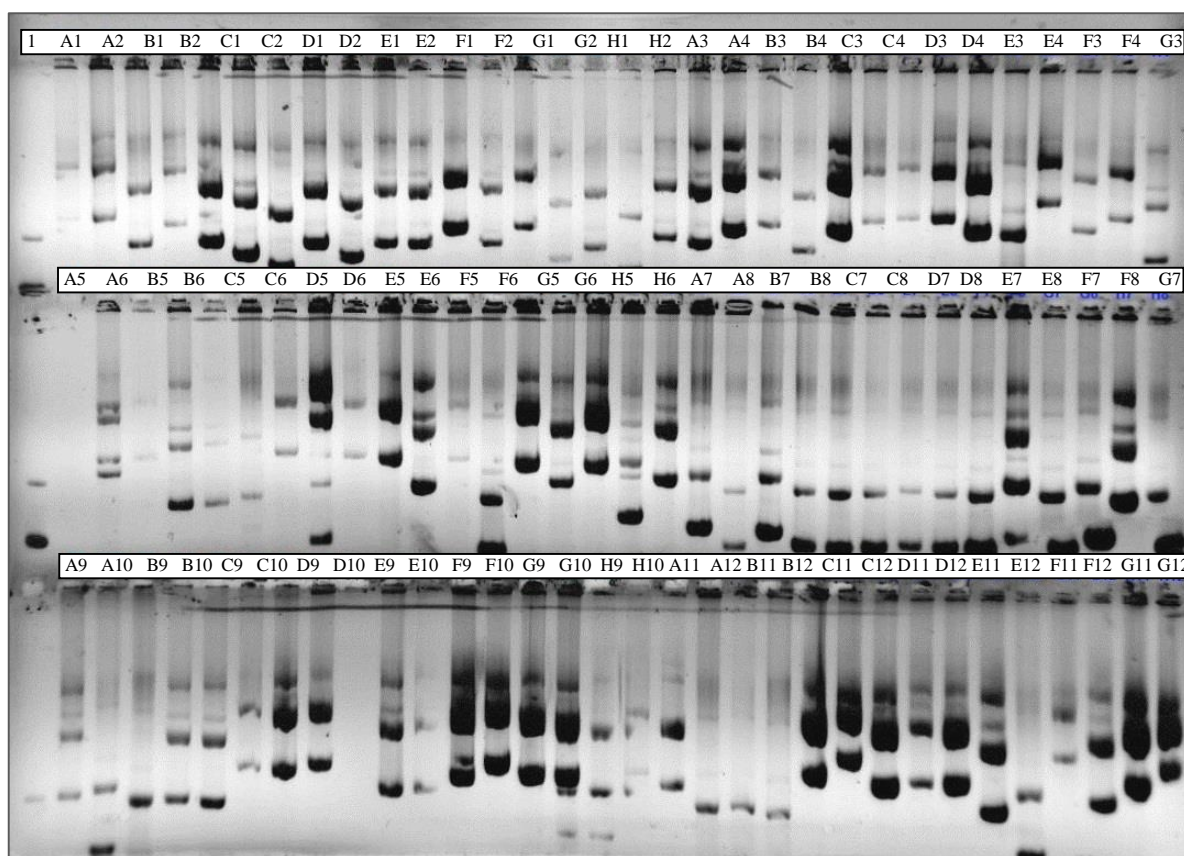


FONTE: AUTOR, 2012.

LEGENDA: Eletroforese de DNA em gel de agarose mostrando na linha 1 o marcador de peso molecular e nas linhas 2, 3 e 4 os perfis de restrição do fosmídeo pM01 após digestão com as enzimas *EcoRI*, *PstI* e *XbaI*, respectivamente.

Os fragmentos gerados por nebulização e restrição foram ligados aos vetores correspondentes e transformados. As colônias transformantes tiveram seu plasmídeo extraído. A presença de inserto nos subclones foi confirmada por eletroforese de DNA em gel de agarose, onde os plasmídeos purificados foram comparados com o vetor original sem inserto. A Figura 11 mostra o resultado da eletroforese referente a uma das placas de 96 poços obtidas.

FIGURA 11 – DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE INSERTO NOS CLONES REFERENTES A UMA PLACA DE 96 POÇOS OBTIDA

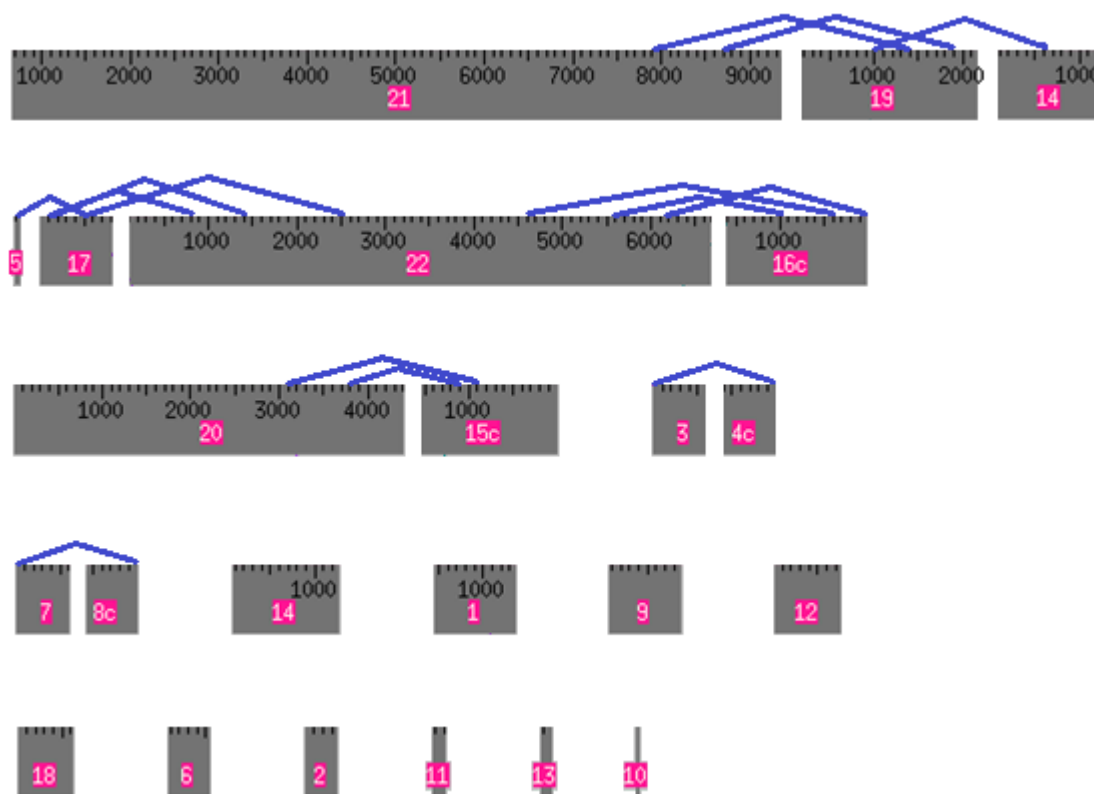


FONTE: AUTOR, 2012.

LEGENDA: Eletroforese de DNA em gel de agarose 0,8% mostrando na linha 1 o vetor original pGEM®-3ZF(+) e nas demais linhas os subclones correspondentes.

Foram sequenciados 171 clones e foram obtidas 324 leituras. A sequência dos vetores foi mascarada durante o processo de montagem. Após a montagem das sequências, foram obtidos 22 contigs e 14 scaffolds, num total de 39011 pb sequenciados (Figura 12). Após remoção das sequências correspondentes ao genoma de *E. coli*, foram obtidos 34510 pb, sugerindo que aproximadamente 96% do inserto original foi sequenciado. Uma das extremidades do inserto está no contig 17, e a outra formou sozinha o contig 13.

FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS 22 CONTIGS E 14 SCAFFOLDS MONTADOS



FONTE: AUTOR, 2012.

NOTA: A graduação nas régua representa a quantidade de pares de bases de cada contig, os números no formato X representam o nome dado ao contig e as linhas azuis representam as ligações entre os contigs formando scaffolds.

### 5.3 ANOTAÇÃO DOS CONTIGS

A Tabela 9 apresenta os produtos gênicos/organismos de maior similaridade encontrados para as ORFs anotadas pelo programa *Artemis* nos 22 contigs obtidos. Os contigs não citados não apresentavam prováveis ORFs inteiras de acordo com a anotação. Dentre as proteínas com possível interesse biotecnológico, encontram-se 3 proteases, presentes nos contigs 14, 19 e 22.

TABELA 9 – ANOTAÇÃO DOS CONTIGS

		continua	
CONTIG/PRODUTO	ORGANISMO	IDENTIDADE / POSITIVOS	VALOR E
1 Acetiltransferase	<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> IMCC9480	62% / 74%	7E <sup>-87</sup>
12 Componente ligador de ATP de transportador BC	<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> IMCC9480	62% / 80%	1E <sup>-87</sup>
14 Componente ligador de ATP de transportador BC	<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> IMCC9480	56% / 76%	1E <sup>-41</sup>
Peptidase putativa da família S9A	<i>Janthinobacterium</i> sp. PAMC 25724	71% / 80%	4E <sup>-121</sup>
15 tRNA nucleotidiltransferase	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	78% / 86%	6E <sup>-72</sup>
Glutathione S-transferase	<i>Janthinobacterium</i> sp. PAMC 25724	67% / 78%	6E <sup>-112</sup>
Mureína lítica solúvel precursor da transglicosilase	<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> IMCC9480	76% / 88%	4E <sup>-76</sup>
16 Proteína hipotética PMI16_02942	<i>Herbaspirillum</i> sp. CF444	49% / 66%	2E <sup>-176</sup>
17 Transportador ABC permease de Na <sup>+</sup>	<i>Rubrivivax benzoatilyticus</i> JA2	42% / 61%	1E <sup>-36</sup>
18 tRNA nucleotidiltransferase / poli(A) polimerase	<i>Herbaspirillum</i> sp. CF444	68% / 78%	5E <sup>-95</sup>
19 Precursor de protease neutra	<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331	67% / 79%	0
20 Ribose-fosfato pirofosfoquinase	<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331	91% / 96%	0
Proteína ribossomal L25, forma CTC	<i>Herbaspirillum</i> sp. CF444	67% / 82%	4E <sup>-77</sup>
Gama-glutamyltransferase	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> SK60	63% / 78%	0
Mureína lítica solúvel putativa da transglicosilase	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	48% / 63%	5E <sup>-23</sup>
5-formiltetraidrofolato ciclo-ligase putativa	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	46% / 65%	4E <sup>-52</sup>

			conclusão
CONTIG/PRODUTO	ORGANISMO	IDENTIDADE / POSITIVOS	VALOR E
21			
4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase	<i>Janthinobacterium</i> sp. PAMC 25724	82% / 89%	0
Fenilalanina-4-hidroxilase	<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331	70% / 82%	4E <sup>-150</sup>
S-adenosilmetionina sintetase	<i>Acidovorax</i> sp. CF316	95% / 98%	0
Proteína conservada não caracterizada	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	58% / 73%	5E <sup>-109</sup>
Regulador transcricional, família AsnC	<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> IMCC9480	81% / 87%	2E <sup>-91</sup>
Fitanoil-CoA dioxigenase	<i>Flavobacterium</i> sp. F52	46% / 63%	8E <sup>-92</sup>
Proteína hipotética ACPL_3450	<i>Actinoplanes</i> sp. SE50/110	36% / 49%	7E <sup>-25</sup>
Lauroil aciltransferase de biossíntese de lipídeo A	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille	67% / 81%	4E <sup>-143</sup>
Lauroil/miristoil aciltransferase	<i>Herbaspirillum</i> sp. CF444	69% / 82%	2E <sup>-125</sup>
22			
Transportador ABC permease de Na <sup>+</sup>	<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	48% / 64%	2E <sup>-23</sup>
Transportador ABC ligador de ATP proteína de Na <sup>+</sup>	<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	63% / 73%	1E <sup>-104</sup>
Proteína peptidase da família S33	<i>Rubrivivax gelatinosus</i> IL144	48% / 63%	3E <sup>-132</sup>
Adenina glicosilase A/G-específica	<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331	60% / 70%	8E <sup>-144</sup>
Proteína hipotética CFU_0616	<i>Collimonas fungivorans</i> Ter331	69% / 83%	0
Formamidopirimidina/5-formiluracil/5-hidroximetiluracil DNA glicosilase	<i>Janthinobacterium</i> sp. PAMC 25724	65% / 78%	1E <sup>-130</sup>

FONTE: AUTOR, 2012.

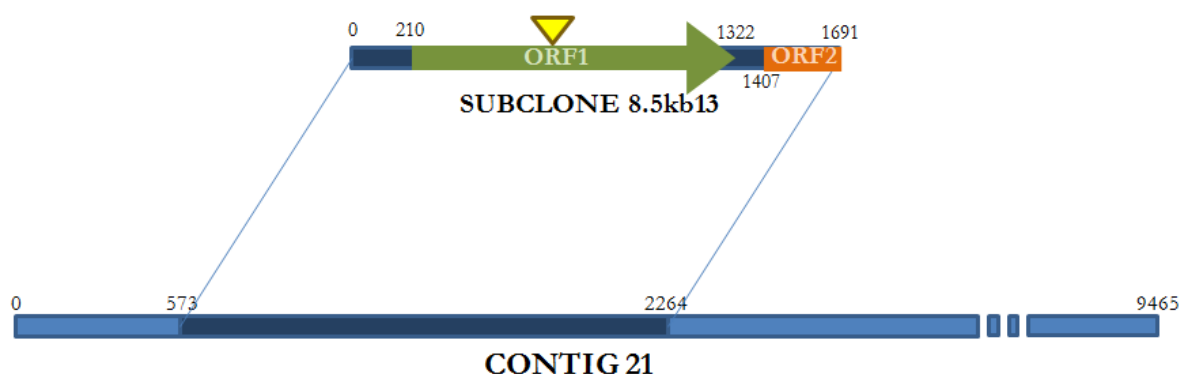


#### 5.4 IDENTIFICAÇÃO DO(S) GENE(S) RESPONSÁVEIS PELO FENÓTIPO

Um dos subclones da sub-biblioteca de fragmentos de nebulização, denominado 8.5kb13, apresentou o mesmo fenótipo visível (produção de composto marrom) do clone metagenômico M01. Seu sequenciamento revelou um inserto de 1691 pb que contém uma ORF inteira de 1089 pb (*orf1*), codificando uma proteína de 362 aminoácidos, e uma ORF parcial (*orf2*). Ensaios de mutação por transposon revelaram que, em 12 mutantes que perderam o fenótipo, a inserção ocorreu dentro da ORF1.

A sequência do clone 8.5kb13 encontra-se entre as bases 573 e 2264 do contig 21, que possui ao todo 9465 pb (Figura 13).

FIGURA 13 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA LOCALIZAÇÃO DA ORF1, ESSENCIAL PARA A PRODUÇÃO DO COMPOSTO MARROM



FONTE: AUTOR, 2012.

LEGENDA: ▼ representa mutação por transposon.

De acordo com os resultados de BLAST, a ORF1 apresenta alta similaridade com a enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4-HPPD) de vários microrganismos. A Tabela 10 apresenta os cinco organismos com maior similaridade, sendo esses pertencentes à classe *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales*.

TABELA 10 – RESULTADO DE BLAST PARA A ORF1

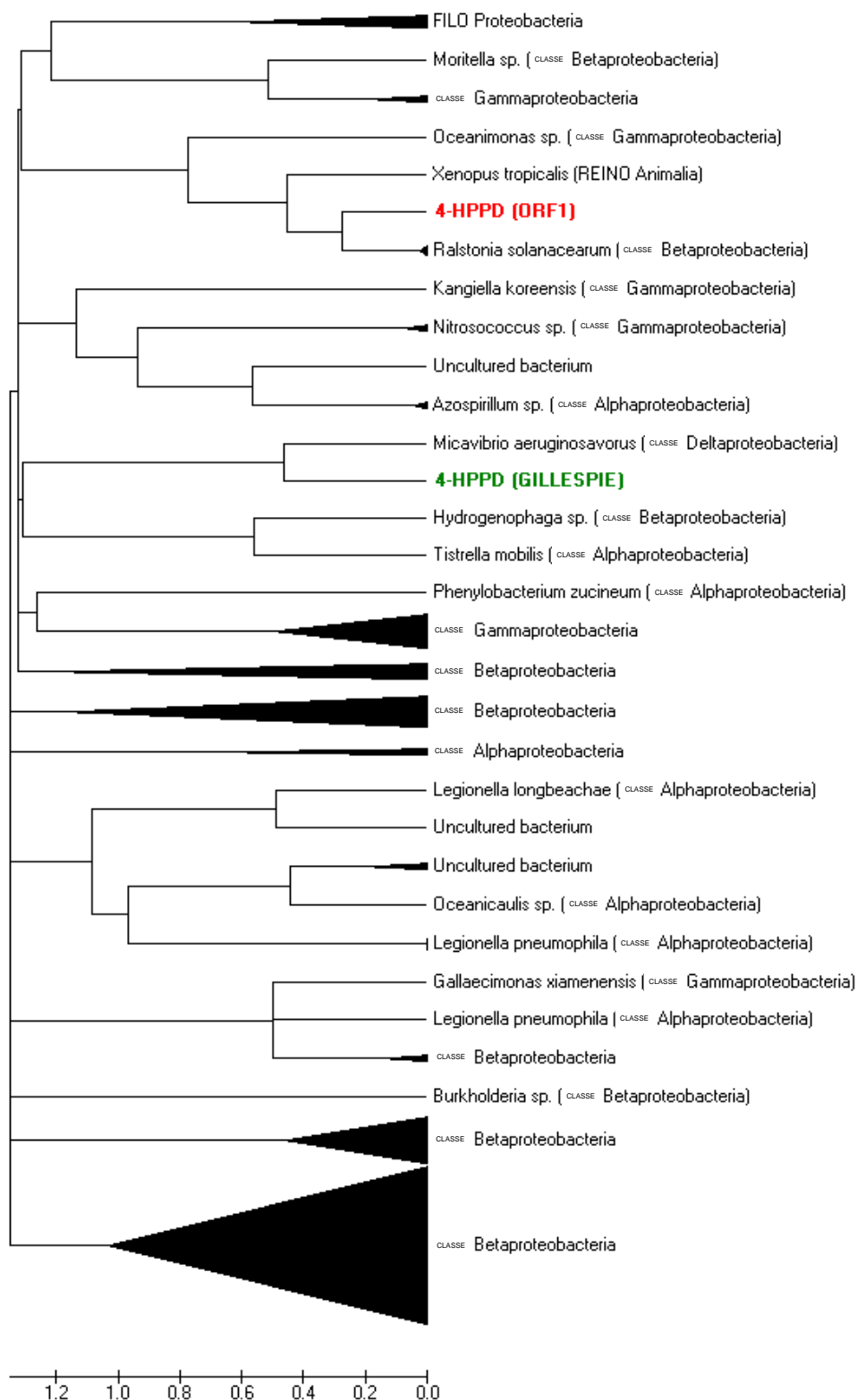
ORGANISMO	IDENTIDADE MÁXIMA	POSITIVOS	VALOR E
<i>Janthinobacterium</i> sp. PAMC 25724	82%	89%	0
<i>Oxalobacteraceae bacterium</i> IMCC9480	81%	88%	0
<i>Burkholderia oklahomensis</i> EO147	77%	87%	0
<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1003	75%	88%	0
<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	77%	87%	0

FONTE: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado em 28/11/2012.

Comparando com a enzima encontrada por GILLESPIE *et al.* (2002), o produto da ORF1 apresenta 55% de identidade e 73% de positivos (valor E de  $4E^{-147}$ ).

A árvore taxonômica resultante sugere que o organismo original da proteína 4-HPPD codificada pela ORF1 pertence ao filo *Proteobacteria* (Figura 14). As bactérias desse filo são geralmente bastante versáteis em sua capacidade de degradação, sendo comumente encontrada em amostras ambientais, sobretudo solo (RABUS, 2005; SAITO *et al.*, 2008; MARTIN *et al.*, 2012). Os organismos de menor distância filogenética são bastante variados no que diz respeito à classe.

FIGURA 14 – ÁRVORE TAXONÔMICA PARA A ENZIMA 4-HPPD CODIFICADA PELA ORF1



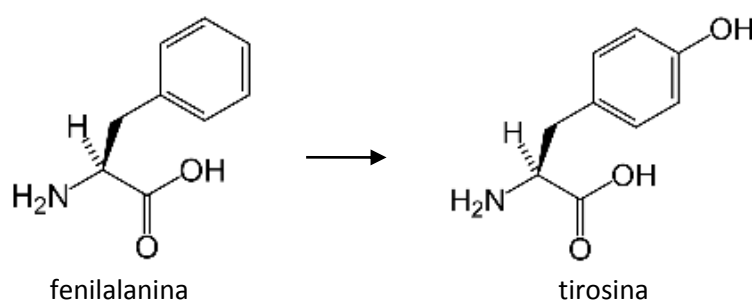
FONTE: AUTOR, 2012.

NOTA: A distância evolucionária está dada em número de substituições de aminoácidos por sítio (média).

### 5.4.1 Contig 21

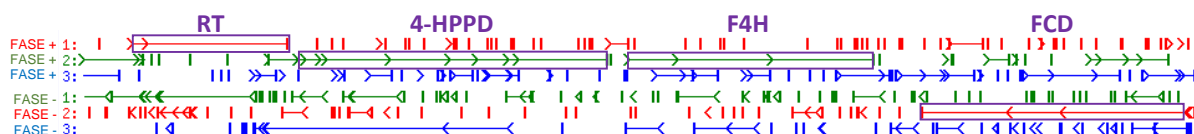
Além do gene responsável pela expressão da enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, a qual é responsável pela produção do composto marrom, outro gene correlato foi encontrado em posição adjacente, aquele para fenilalanina 4-hidroxilase, que converte fenilalanina em tirosina (Figura 15). Conforme mostrado na Figura 3, a tirosina é precursor para 4-hidroxifenilpiruvato, substrato da 4-HPPD.

FIGURA 15 – REAÇÃO CATALISADA PELA FENILALANINA-4-HIDROXILASE



Ambos os genes estão em fase e se encontram separados por 963 pb (Figura 16). Os demais genes encontrados na região codificam para fitanoil-CoA dioxigenase, enzima envolvida na via de  $\alpha$ -oxidação, e um regulador de transcrição.

FIGURA 16 – REGIÃO DO CONTIG 21 (BASES 1 A APROXIMADAMENTE 4000)



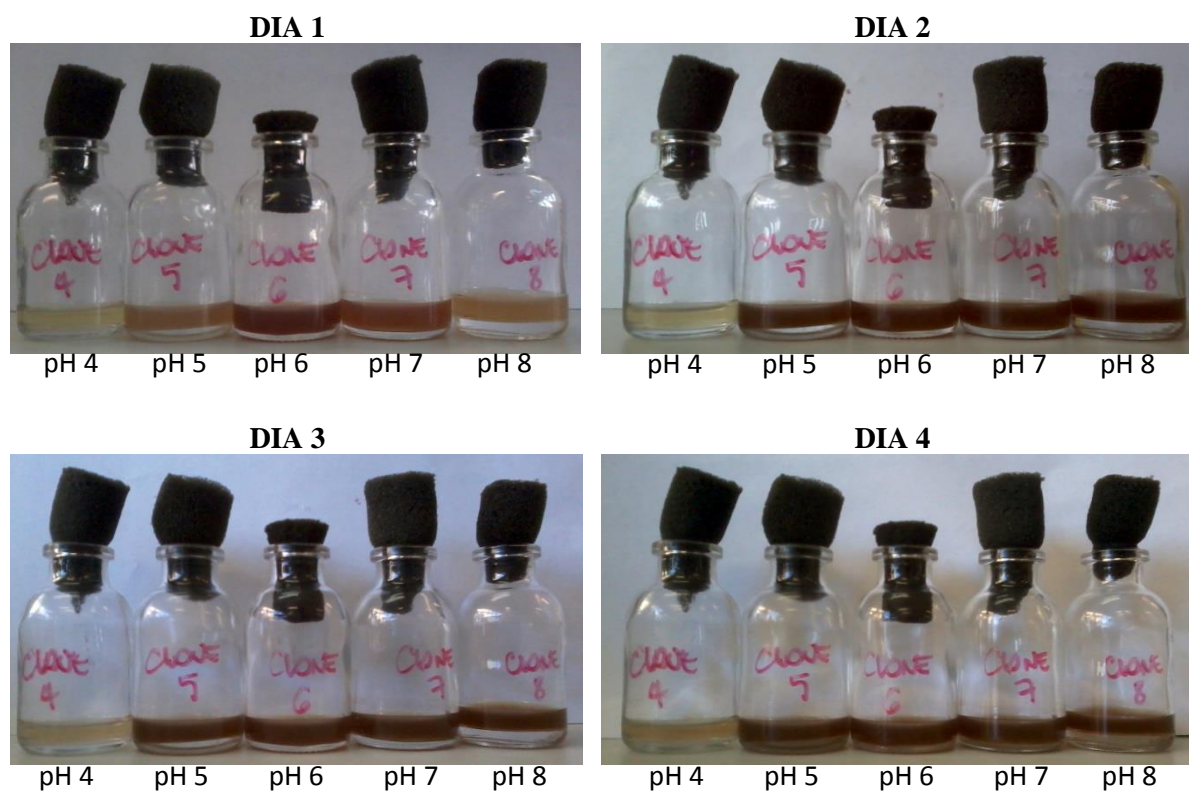
FONTE: AUTOR, 2012.

LEGENDA: ➤ indica códon iniciador (ATG), | indica códon terminador (TGA). 4-HPPD: 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, F4H: fenilalanina-4-hidrolase, FCD: fitanoil-CoA dioxigenase, RT: regulador de transcrição.

## 5.5 PRODUÇÃO DO COMPOSTO MARROM

A produção do composto marrom foi testada inoculando o clone 8.5kb13 em diferentes pHs e meios de cultura. A Figura 17 resume a produção diferencial como função temporal do pH inicial em meio LB e a Figura 18, como função temporal da composição do meio de cultura utilizado, sendo possível sugerir por análise visual que o rendimento é uma função das condições físico-químicas e temporais testadas.

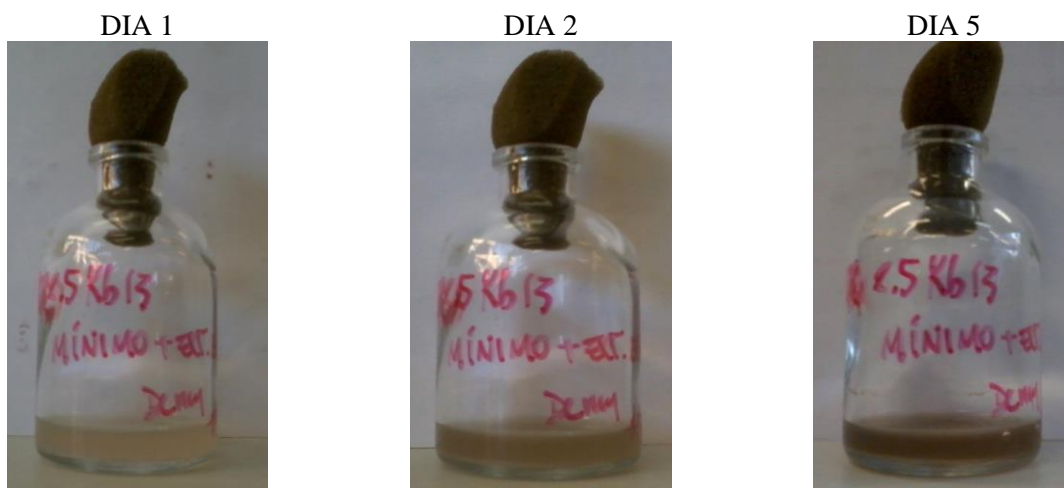
FIGURA 17 – PRODUÇÃO DO COMPOSTO MARROM EM DIFERENTES pHs INICIAIS



FONTE: AUTOR, 2012.

NOTA: Como controle negativo foi inoculada a bactéria contendo o vetor pGEM®-3Zf(+) sem inserto (resultados não mostrados).

FIGURA 18 - PRODUÇÃO DO COMPOSTO MARROM EM MEIO MÍNIMO (M9) SUPLEMENTADO COM EXTRATO DE LEVEDURA



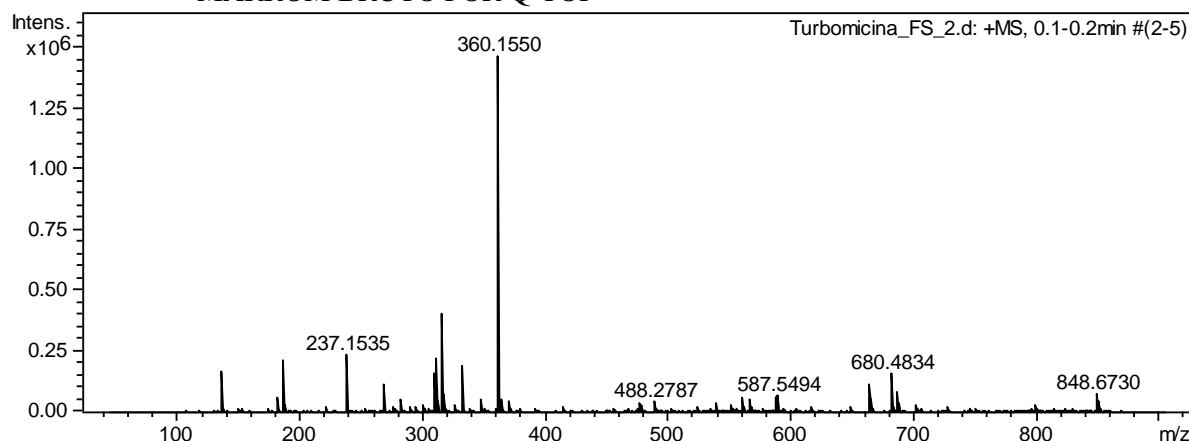
FONTE: AUTOR, 2012.

NOTA: Como controle foi inoculada a bactéria contendo o vetor pGEM®-3Zf(+) sem inserto (resultados não mostrados).

## 5.6 EXTRAÇÃO DO COMPOSTO MARROM

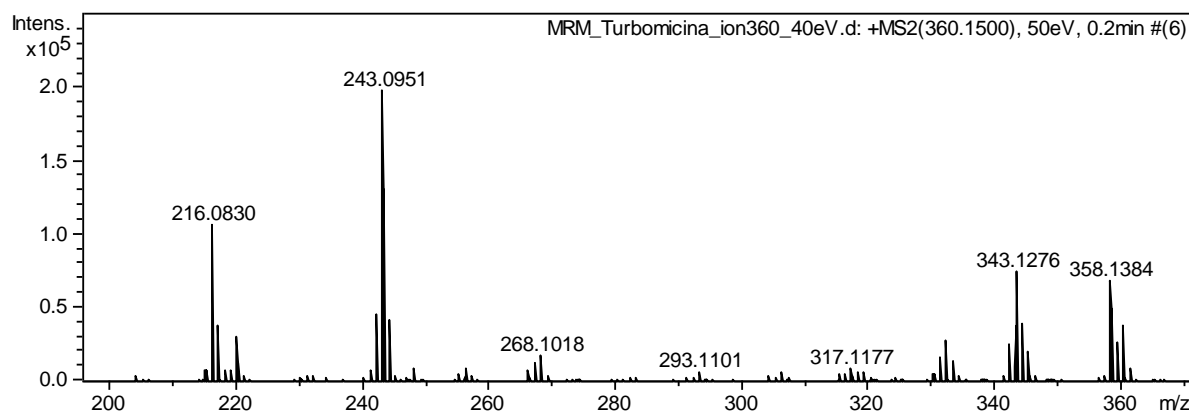
Após a produção, extração e secagem do composto marrom, foi possível recuperar aproximadamente 250 mg de composto marrom por litro de meio de cultura inoculado com o clone metagenômico M01 ou com o subclone 8.5kb13. O composto marrom foi analisado por espectrometria de massa em Q-TOF (Figura 19), onde foi possível observar, entre outros, a presença de um pico com razão massa/carga de 360,1550.

FIGURA 19 – ESPECTROGRAMA DE MASSA/CARGA OBTIDO PARA O COMPOSTO MARROM BRUTO POR Q-TOF



Esse pico foi selecionado para fragmentação, e os fragmentos foram novamente analisados por Q-TOF (Figura 20). Os dados obtidos foram analisados pelo programa *SmartFormula 3D* para determinar a mais provável fórmula estrutural para o pico parental. A fórmula que resulta no menor erro na medição da massa/carga do pico parental (13 ppm) é  $C_{25}H_{18}N_3$ . É interessante observar que essa é a mesma fórmula estrutural da turbomicina A (Figura 5).

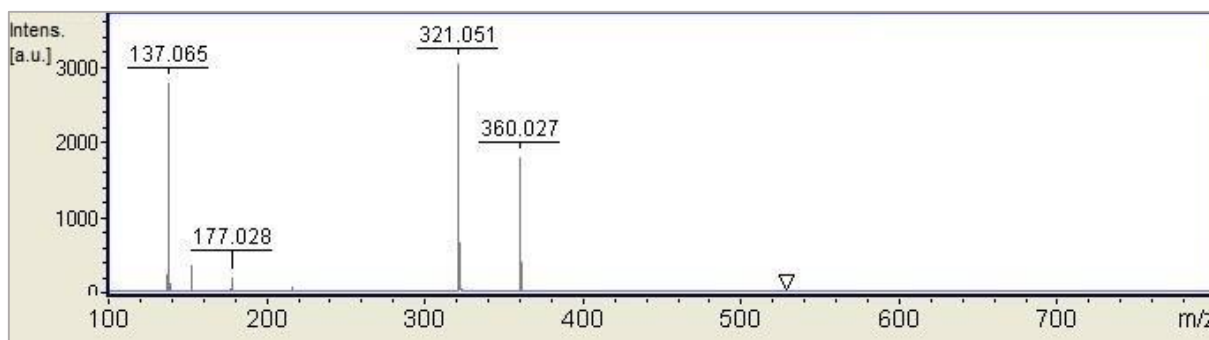
FIGURA 20 – ESPECTROGRAMA DE MASSA/CARGA OBTIDO PARA OS FRAGMENTOS DO PICO COM M/Z 360,1550 POR QTOF



Adicionalmente, o composto marrom foi analisado por MALDI-TOF (Figura 21), onde foi possível observar, entre outros, a presença de dois picos com razão massa/carga de 321,051 e 360,027. É importante observar que, assumindo que esses compostos

tenham massa igual às das turbomicinas B e A, respectivamente, o erro associado seria de 274 e 341 ppm.

FIGURA 21 - ESPECTROGRAMA DE MASSA/CARGA OBTIDOS PARA O COMPOSTO MARROM BRUTO POR MALDI-TOF

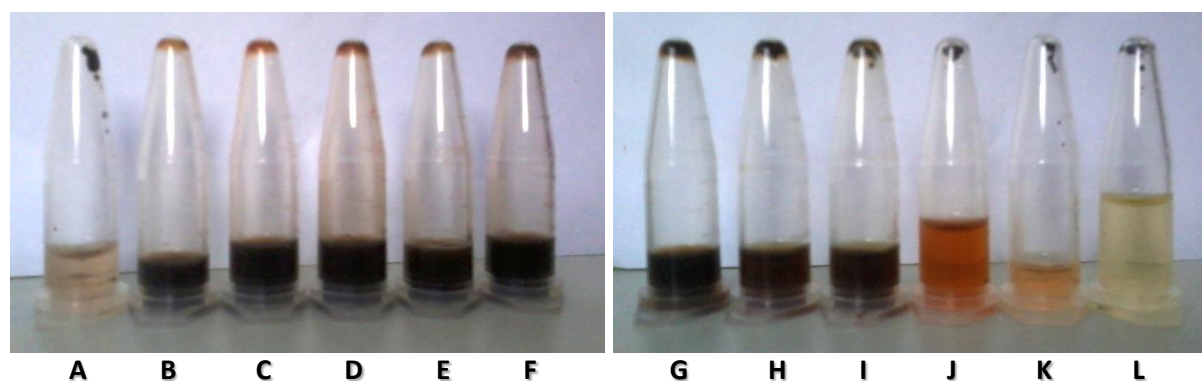


FONTE: AUTOR, 2012.

A solubilidade do composto marrom foi testada em diferentes solventes aquosos e orgânicos (Figura 22), sendo possível observar também a quantidade de material não solubilizado no fundo de cada tubo. O material solubilizado foi resolvido através de TLC, onde foi possível evidenciar visualmente um ponto marrom na origem e a presença de bandas absorvendo em luz visível e UV (Figura 23). Em luz visível, ainda se fazem observar bandas de coloração laranja e vermelha, solubilizadas diferencialmente em função do solvente utilizado.



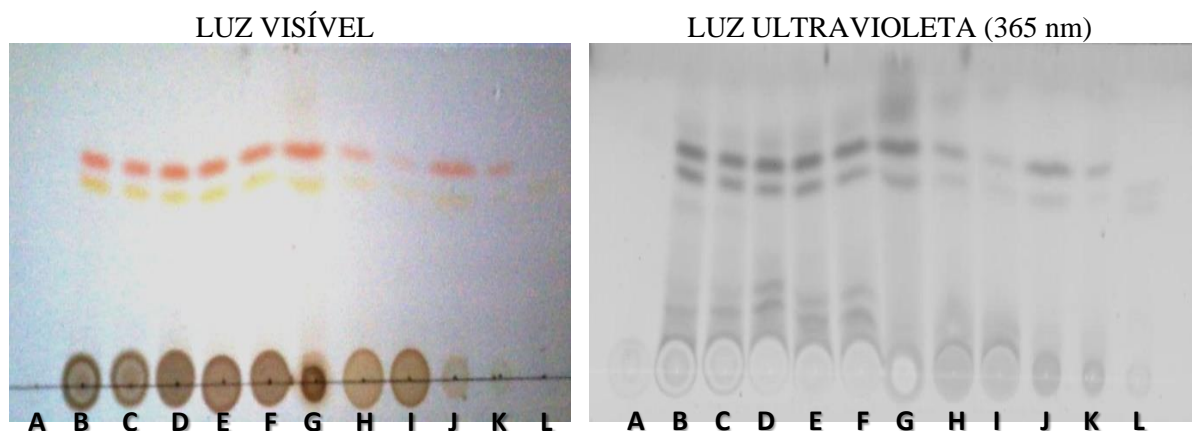
FIGURA 22 – SOLUBILIDADE DO COMPOSTO MARROM EM DIFERENTES SOLVENTES AQUOSOS (A-F) E ORGÂNICOS (G-L)



FONTE: AUTOR, 2012.

LEGENDA: A) tampão Tris-HCl pH 6,8; B) tampão Tris-HCl pH 8,8; C) tampão Tris-base pH 11,0; D) tampão fosfato pH 8,0; E) tampão fosfato pH 3,0; F) tampão fosfato pH 11,0; G) metanol; H) metanol:tampão fosfato pH 8,0 80:20; I) metanol:tampão fosfato pH 8,0 50:50; J) 2-butanol; K) acetato de etila; L) isopropanol.

FIGURA 23 – CROMATOGRAMA RESOLVIDO POR TLC DO MATERIAL SOLUBILIZADO NOS DIFERENTES SOLVENTES



FONTE: AUTOR, 2012.

LEGENDA: A) tampão Tris-HCl pH 6,8; B) tampão Tris-HCl pH 8,8; C) tampão Tris-base pH 11,0; D) tampão fosfato pH 8,0; E) tampão fosfato pH 3,0; F) tampão fosfato pH 11,0; G) metanol; H) metanol:tampão fosfato pH 8,0 80:20; I) metanol:tampão fosfato pH 8,0 50:50; J) 2-butanol; K) acetato de etila; L) isopropanol.

A solubilização tanto da piomelanina quanto das bandas coloridas foi comparável em todos os solventes aquosos (com exceção do tampão Tris-HCl pH 6,8, onde não houve solubilização visível) e em metanol.

## 5.7 FRACIONAMENTO DO COMPOSTO MARROM

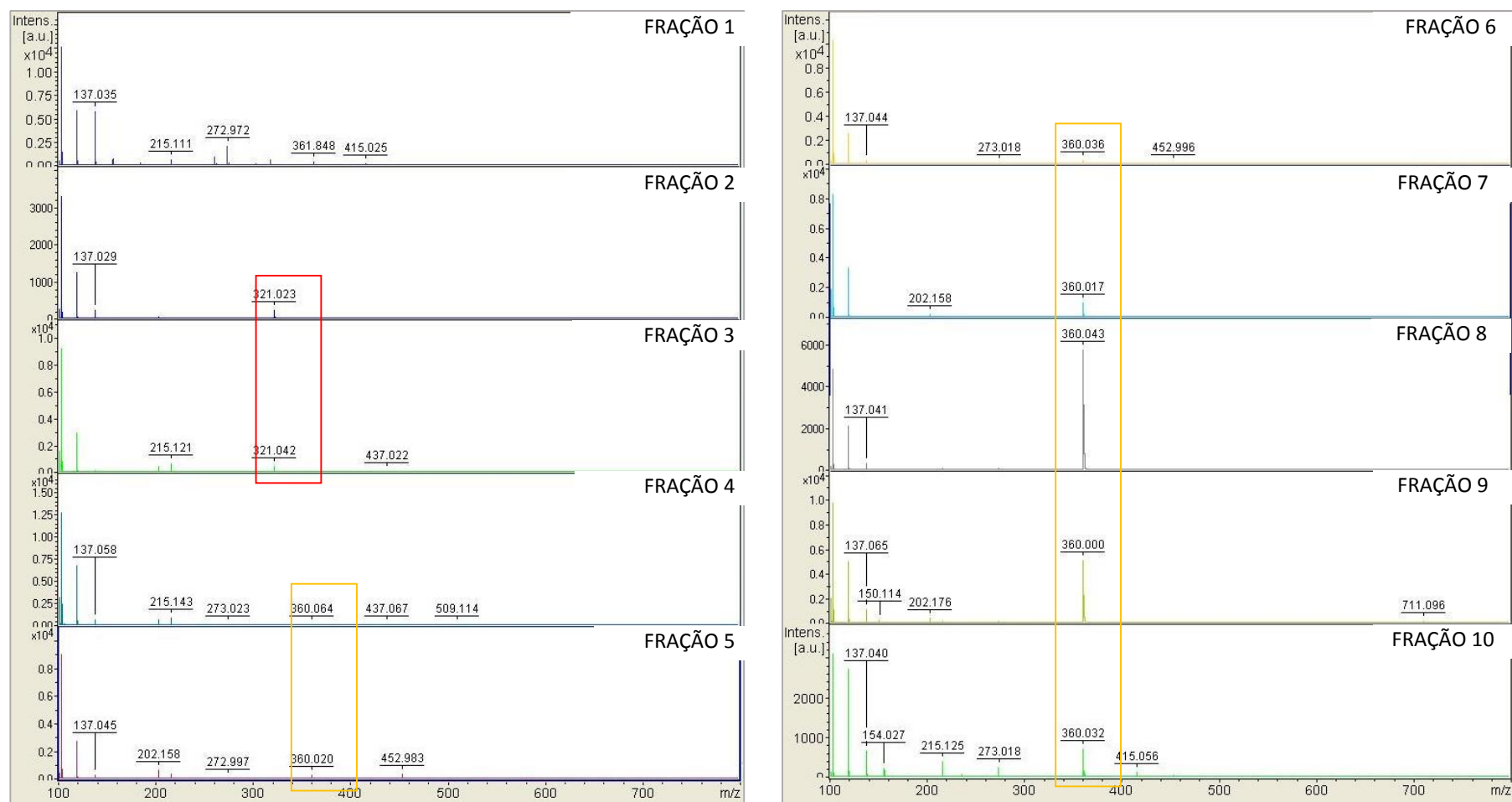
Ao final do processo de fracionamento do composto marrom por cromatografia de fase normal, as 10 frações obtidas foram analisadas por MALDI-TOF. A Figura 24 apresenta os espectrogramas obtidos, que permitem confirmar a separação dos picos com razão massa/carga na faixa de 321 e 360.

Em função das evidências reunidas até aqui, as frações 2 e 3 foram reunidas e doravante denominadas fração TbB (turbomicina B), e as frações 5 a 10 foram reunidas e doravante denominadas fração TbA (turbomicina A).

Após a terceira etapa de fracionamento por cromatografia de fase normal, foram obtidas 10 frações para cada turbomicina fracionada. A Figura 25 e a Figura 26 mostram os espectrogramas de massa/carga obtidos para a purificação das frações TbA e TbB, respectivamente, através de análise por MALDI-TOF. Em virtude desses resultados, as frações 1 a 3 de turbomicina foram reunidas para os ensaios seguintes.

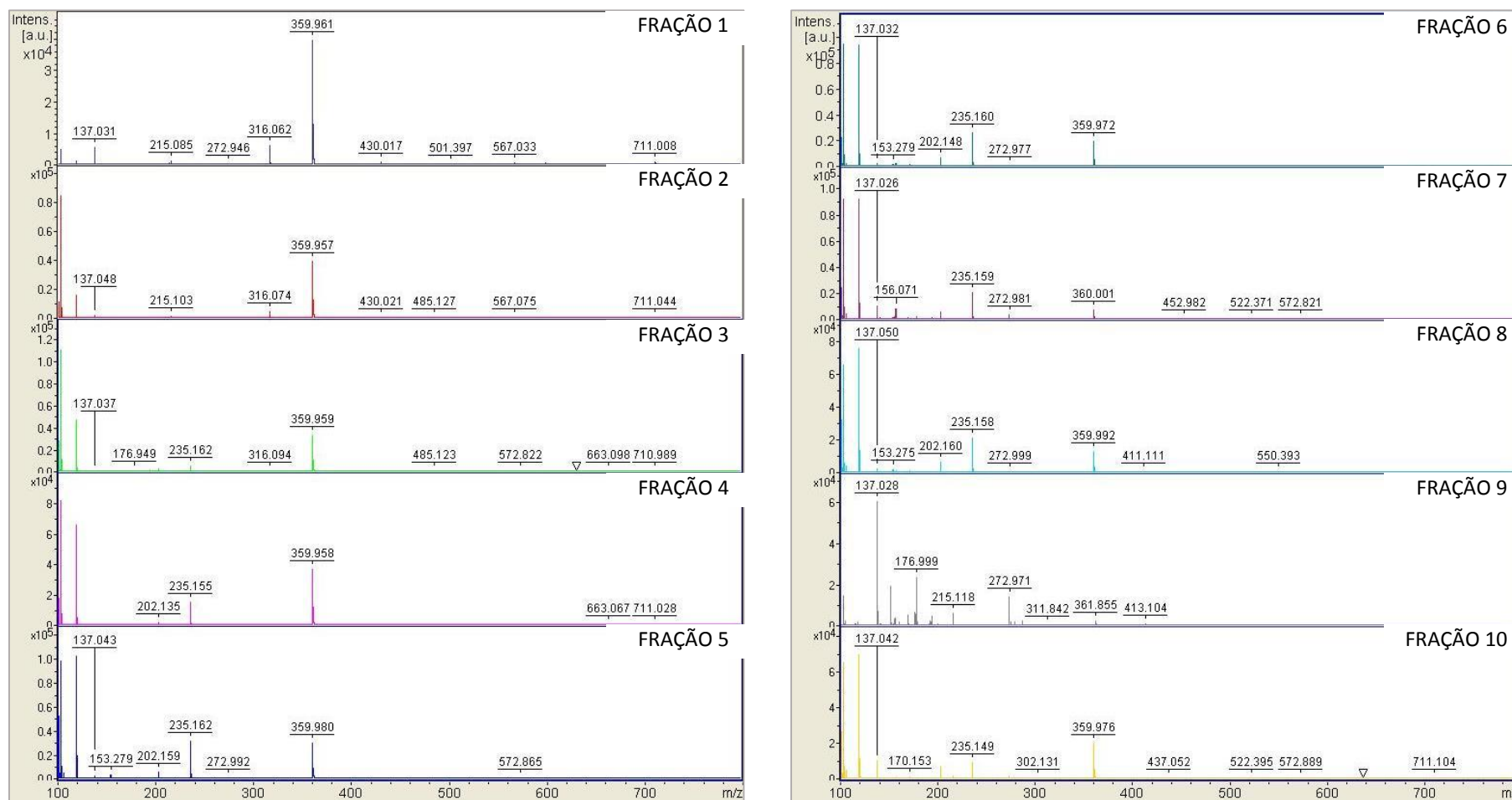
Ao final de várias etapas de purificação, foram obtidos 58,4 mg de turbomicina A e 84,2 mg de turbomicina B, que foram ressuspensos em clorofórmio:metanol 80:20 na concentração de 100 mg/mL.

FIGURA 24 – ESPECTROGRAMAS DE MASSA/CARGA OBTIDOS PARA AS FRAÇÕES 1-10 APÓS FRACIONAMENTO DO COMPOSTO MARROM POR CROMATOGRAFIA DE FASE NORMAL



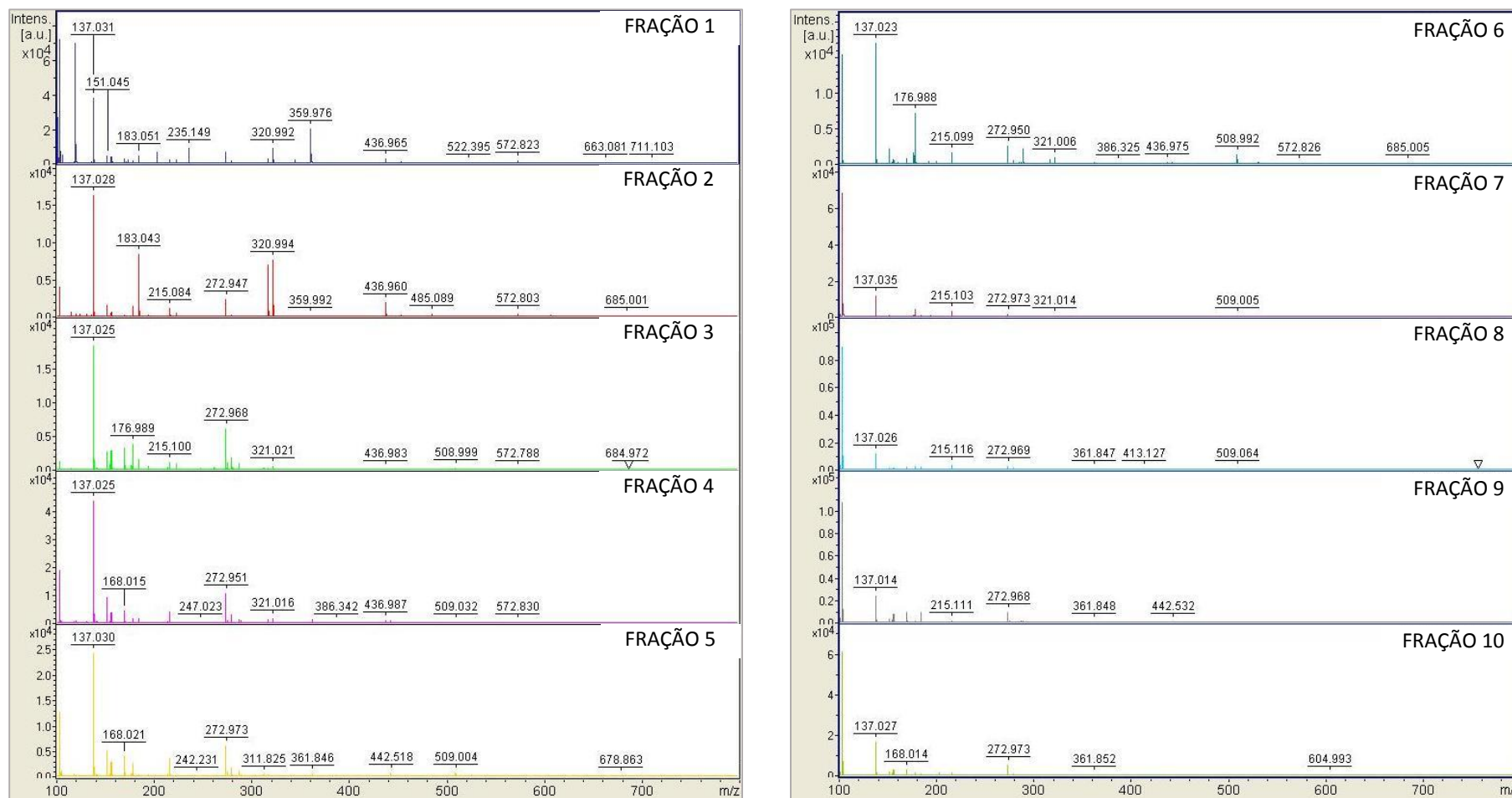
FONTE: AUTOR, 2012.

FIGURA 25 – ESPECTROGRAMAS DE MASSA/CARGA OBTIDOS PARA AS FRAÇÕES 1-10 APÓS FRACIONAMENTO DA TURBOMICINA A POR CROMATOGRAFIA DE FASE NORMAL



FONTE: AUTOR, 2012.

FIGURA 26 – ESPECTROGRAMAS DE MASSA/CARGA OBTIDOS PARA AS FRAÇÕES 1-10 APÓS FRACIONAMENTO DA TURBOMICINA B POR CROMATOGRAFIA DE FASE NORMAL



FONTE: AUTOR, 2012.

## 5.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS TURBOMICINAS ISOLADAS

A Tabela 11 apresenta o antibiograma obtido para o ensaio das estirpes patogênicas testadas com a fração TbA.

TABELA 11 – ANTIBIOGRAMA PARA A FRAÇÃO TbA PURIFICADAS

ESTIRPE	MASSA DE FRAÇÃO TbA UTILIZADA (µg)		
	10	100	1000
Bactérias Gram-negativas			
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-
<i>S. enterica</i> ATCC BAA 664	-	-	-
<i>A. hydrophyla</i> ATCC 7966	-	-	-
<i>Klebsiela pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	-	-
Bactérias Gram-positivas			
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	-	+	+
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+/-	+/-	+

FONTE: AUTOR, 2012.

LEGENDA: -, sem inibição; +/-, zona de inibição até 3 mm; + zona de inibição maior que 3 mm.

A fração TbA não apresentou atividade antibiótica em nenhuma das estirpes Gram-negativas testadas. Comparando os resultados com aqueles obtidos por GILLESPIE *et al.* (2002) (Tabela 1) parece haver divergência apenas para *S. enterica*, entretanto naquele trabalho foi utilizada outra estirpe. Os resultados para as bactérias Gram-positivas são compatíveis, diferindo na quantidade de turbomicina A utilizada e nas estirpes testadas.

## 6 DISCUSSÃO

A taxa atual de descoberta de novas drogas tem sido muito baixa, pois ela depende classicamente do isolamento, manutenção e crescimento do microrganismo obtido do ambiente responsável pela sua síntese em condições controladas para produção industrial. Nesse sentido, a metagenômica tem sido uma metodologia inovadora. A abordagem busca eliminar a necessidade de cultivo do microrganismo original, transferindo seu material genético para um microrganismo cujas condições de cultivo já sejam estabelecidas, e dessa forma obter a expressão do fenótipo original. Isso pode ser alcançado pela prospecção funcional de colônias transformadas com DNA ambiental, onde o fenótipo é investigado em condições que favoreçam sua expressão e visualização. A produção de antibióticos por clones metagenômicos pode ser pesquisada inoculando o clone junto com o microrganismo patogênico estudado, onde se espera ver uma inibição do crescimento do último.

GLOGAUER (2011) obteve um clone metagenômico produtor de composto marrom. Uma única ORF é responsável por sua expressão, como pôde ser confirmado por mutagênese com transposon. O produto dessa ORF foi identificado através de sequenciamento como sendo homólogo à enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4-HPPD). Essa enzima catalisa a produção de homogentisato (HGA), que pode ser excretado e polimerizado em piomelanina. Em paralelo à produção de piomelanina, através de um mecanismo ainda não elucidado mas que parece envolver HGA e indóis produzidos naturalmente pelo organismo hospedeiro, ocorre a formação de turbomicina A e B.

A análise filogenética (Figura 14) da estrutura primária da enzima 4-HPPD descrita neste trabalho revelou que o microrganismo original evoluiu do filo *Proteobacteria*. Este filo compreende bactérias Gram-negativas com forma e metabolismo bastante variado. A descoberta de moléculas produzidas por essas bactérias com atividade biológica, inclusive citotóxica, é bem recente, e demonstra o quanto o potencial biológico não só desse filo, mas de toda a microbiota ambiental, ainda carece de investigação e exploração.

Apesar da produção do composto marrom pelo clone ou subclone metagenômico em condições padronizadas de cultivo em laboratório já ser suficiente para expressão e extração do composto marrom em quantidade mensurável, os resultados apresentados (item 5.7) mostram que o processo pode ser otimizado. As variáveis testadas, variação do pH e da composição do meio de cultivo, já mostram expressão temporal diferencial, mas ainda se faz necessário testar outras condições para essas variáveis. Além disso, outras variáveis ainda precisam ser consideradas, como por exemplo temperatura de cultivo, taxa de aeração e suplementação com precursores.

O fato de o composto marrom ser produzido em meio de cultivo com composição mais simples (item 5.7) pode facilitar a sua extração, uma vez que se espera que estejam presentes no meio após cultivo, nessas condições, metabólitos mais simples. Entretanto é preciso levar em consideração que a composição mais simples do meio pode afetar a velocidade de crescimento do microrganismo e da produção do composto marrom, assim como sua concentração máxima.

O composto marrom bruto, a piomelanina, as turbomicinas e os demais contaminantes solubilizam diferencialmente em soluções com diferentes polaridades e pH (item 5.8). A solubilidade é fator determinante na escolha das condições para a extração e purificação de moléculas. A utilização de solventes aquosos nessas etapas costuma ser preferencial, uma vez que em geral eles costumam ser mais baratos, mais universais no que se refere aos materiais e equipamentos necessários e menos perigosos no manuseio. Dessa forma, a otimização na escolha do solvente adequado pode auxiliar no fracionamento das moléculas de interesse. Outros fatores que podem ser considerados no aprimoramento do fracionamento são alterações no processo (eliminação, inclusão ou alteração do tamanho das colunas, por exemplo) e alteração na composição/concentração da fase móvel.

A fração purificada de turbomicina A apresentou atividade antibiótica contra as bactérias Gram-positivas testadas, o que reforça sua potencial atividade biológica. Os resultados obtidos foram similares aos de GILLESPIE *et al.* (2002) para essa molécula, diferindo apenas em concentração e estirpe. Entretanto, é necessário otimizar a purificação para confirmar se a atividade observada pode ser conferida exclusivamente



à molécula de turbomicina A. Além disso, ainda se faz necessário investigar a possível atividade antibiótica da turbomicina B. Outras atividades biológicas das turbomicinas também podem ser testadas.

É interessante observar que 4-HPPD e hidroximandelato sintase (HMAS) possuem domínios N- e C-terminais do mesmo tipo e usam o mesmo substrato, HGA (item 2.2.1). HMAS é responsável pela síntese de um precursor de vancomicina, antibiótico que age sobre bactérias Gram-positivas inibindo a síntese da parede celular ao impedir a ligação cruzada entre dois resíduos de alanina presentes em lados opostos da parede (NAILOR e SOBEL, 2011). O mecanismo de ação da turbomicina ainda não foi desvendado, mas a origem comum pode sugerir um mecanismo similar. Entretanto, ainda é necessário levar em consideração que as duas estruturas são bem diferentes.

As evidências que apontam as moléculas fracionadas neste trabalho como sendo turbomicina A e B são: a ORF responsável pelo fenótipo, que é homóloga à encontrada por GILLESPIE *et al.* (2002); a produção de composto marrom garantida por apenas essa ORF; a produção paralela de moléculas de cor laranja e vermelha; os dados de massa/carga obtidos por Q-TOF e MALDI-TOF e a atividade antibiótica similar à apresentada por GILLESPIE *et al.* (2002).

O fato de que 4-HPPD é uma enzima com baixa especificidade de substrato (item 2.2.1) pode ser explorado para a obtenção de diferentes produtos finais de vias que normalmente utilizem HGA como precursor. Em teoria, partindo da hipótese de que HGA é necessário para a produção de turbomicina, seria possível obter moléculas de turbomicina modificadas através da utilização de substratos modificados. Como mostrado por STEPANOVA *et al.* (2010) no item 2.2.4.1, moléculas modificadas podem ter sua atividade biológica melhorada. Além disso, uma vez que 4-HPPD é uma enzima importante em patologias animais e para produção de cofatores em plantas (item 2.2.1), o potencial dessa enzima como modelo para inibidores que aliviem os sintomas dessas patologias ou que ajam como agente herbicida pode ser investigado.

É possível que as outras moléculas produzidas e extraídas junto com o composto marrom também possuam atividades biológicas passíveis de estudo.

## 7 CONCLUSÕES

- A produção dos compostos coloridos (turbomicina A e B) é dependente de uma única ORF, homóloga ao gene que expressa 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (4-HPPD), enzima responsável pela conversão de 4-hidroxifenilpiruvato (4-HPP) a homogentisato (HGA). Essa conclusão foi confirmada pela inativação do gene por inserção de transposon.
- A ORF1 é homóloga a enzimas da família 4-HPPD de bactérias da classe *Betaproteobacteria*, classe pouco explorada por seu potencial biotecnológico.
- O clone M01 possui uma ORF cujo produto é homólogo à enzima fenilalanina-4-hidroxilase, responsável pela produção de tirosina, precursor de 4-HPP.
- O clone M01 não apresenta nenhum outro gene essencial relacionado direta ou indiretamente com a produção do composto marrom ou das turbomicinas.
- O clone M01 possui três ORFs que codificam para proteases.
- As turbomicinas foram parcialmente purificadas, e a turbomicina A possui atividade antimicrobiana restrita às bactérias Gram-positivas testadas.

## 8 REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic. Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiol. Rev.**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.
- BANIK, J.; BRADY, S. F. Cloning and characterization of new glycopeptide gene clusters found in an environmental DNA megalibrary. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 17273-17277, 2008.
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 36, p. 493-496, 1966.
- BIJTENHOORN, P.; SCHIPPER, C.; HORNUNG, C.; QUITSCHAU, M.; GROND, S.; WEILAND, N.; STREIT, W. R. BpiB05, a novel metagenoma-derived hydrolase acting on N-acylhomoserine lactones. **J. Biotechnol.**, v. 155, p. 86-94, 2011.
- BROWNLEE, J. M.; JOHNSON-WINTERS, K.; HARRISON, D. H.; MORAN, G. R. Structure of the ferrous form of (4-hydroxyphenyl)pyruvate dioxygenase from *Streptomyces avermitilis* in complex with the therapeutic herbicide, NTBC. **Biochem.**, v. 43, p. 6370-6377, 2004.
- BUDZIKIWICZ, H.; ECKAU, H.; EHRENBERG, M. Bis (3-indolyl)-3H-indolyliden-methan, ein von *Saccharomyces cerevisiae* Gebildeter Farbstoff. **Tetrahedron Lett.**, v. 36, p. 3807-3810, 1972.
- CHANG, T. M.; CHUANG, Y. C.; SU, J. H.; CHANG, M. C.; Cloning and sequence analysis of a novel hemolysin gene (vllY) from *Vibrio vulnificus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 3851-3857, 1997.
- CHEMLER, J. A.; YAN, Y.; KOFFAS, M. A. G. Biosynthesis of isoprenoids, polyunsaturated fatty acids and flavonoids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb. Cell Fact.**, v. 5, art. 20, 2006.
- COON, S. L.; KOTOB, S.; JARVIS, B. B.; WANG, S.; FUQUA, W. C.; WEINER, R. M. Homogentisic acid is the product of MelA, which mediates melanogenesis in the marine bacterium *Shewanella colwelliana* D. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 60, p. 3006-3010, 1994.
- ELEND, C.; SCHMEISSER, H.; HOEBENREICH, H. L.; STEELE, W. R. S. Isolation and characterization of a metagenome-derived and cold-active lipase with high stereospecificity for (R)-ibuprofen esters. **J. Biotechnol.**, v. 130, p. 370-377, 2007.
- EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Res.**, v. 8, p. 186-194, 1998b.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v. 8, p. 175-185, 1998a.
- FAN, X.; LIU, X.; LIU, Y. The cloning and characterization of one novel metagenome-derived thermostable esterase acting on N-acylhomoserine lactones. **J. Mol. Cat. B**, v. 83, p. 29-37, 2012.

FUQUA, W. C.; COYNE, V. E.; STEIN, D. C.; LIN, C. M.; WEINER, R. M. Characterization of *melA*: a gene encoding melanin biosynthesis from the marine bacterium *Shewanella colwelliana*. **Gene**, v. 109, p. 131-136, 1991.

GILLESPIE, D. E.; BRADY, S. F.; BETTERMANN, A. D.; CIANCIOOTTO, N. P.; LILES, M. R.; RONDON, M. R.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M.; HANDELSMAN, J. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 4310-4306, 2002.

GISSEN, P.; PREECE, M. A.; WILLSHW, H. A.; McKIERNAN, P. J. Ophthalmic follow-up of patients with tyrosinaemia type I on NTBC. **J. Inherit. Metab. Dis.**, v. 26, p. 13-16, 2003.

GLOGAUER, A. Isolamento de clones com atividade lipolítica do metagenoma de solo contaminado com gordura animal e caracterização e uma nova e eficiente lipase. Curitiba: **Dissertação (Doutorado em Ciências-Bioquímica)**. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2011. 99f.

GOODWIN, T. W.; MERCER, E. I. **Introduction to Plant Biochemistry**. Pergamon Press, Sydney, 1983.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Res.**, v. 8, p.195-202, 1998.

GYANESHWAR, P.; HIRSCH, A. M.; MOULIN, L.; CHEN, W.-M.; ELLIOTT, G. N.; BONTEMPS, C.; DE LOS SANTOS, P. E.; GROSS, E.; REIS, F. B.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Legume-nodulating *Betaproteobacteria*: diversity, host range and future prospects. **Mol. Plant-Microbe Interac.**, v. 24, p. 1276-1288, 2011.

HANDELSMAN, J. E.; Handelsman, J. E.; Goodman, R. M.; Gillespie, D. E.; Bettermann, A. D.; Clardy, J. C.; Brady, S. F. **Triaryl cation antibiotics from environmental DNA**. Int. Cl.<sup>7</sup> C07D 209/02. US 2001/0047029 A1. 23 Feb 2001, 29 Nov 2001.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chem. Biol.**, v. 5, n. 10, p.245-249, 1998.

HAUSINGER, R. P.; KNOX, W. E.; EDWARDS, S. W. Enzymes involved in conversion of tyrosine to acetoacetate. **Methods Enzymol.**, v. 2, p. 287-300.

KUSKE, C. R.; BARNS, S. M.; BUSCH, J. D. Diverse uncultured bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, p. 3614-3621, 1997.

LAVRENOV, S. N.; LUZIKOV, Y. N.; BYKOV, E. E.; REZNIKOVA, M. I.; STEPANOVA, E. V.; GLAZUNOVA, V. A.; VOLODINA, Y. L.; TATARSKY, V. V. Jr.; SHTIL, A. A.; PREOBRAZHENSKEYA, M. N. Synthesis and cytotoxic potency of novel tris(1-alkylindol-3-yl)methylum salts: role of *N*-alkyl substituents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 18, p. 6905-6913, 2010.

LEE, C.-M.; YEO, Y.-S.; LEE, J.-H.; KIM, S.-J. KIM, J.-B.; HAN, N. S., KOO, B.-S.; YOON, S.-H. Identification of a novel 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the soil metagenome. **Bioch. Bioph. Res. Comm.**, v. 370, p. 322-326, 2008.

MARTIN, F.; TORELLI, S.; LE PASLIER, D.; BARBANCE, A.; MARTIN-LAURENT, F.; BRU, D.; GEREMIA, R.; BLAKE, G.; JOUANNEAU, Y. *Betaproteobacteria* dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene. **Environ. Poll.**, v. 162, p. 345-353, 2012.

MENTER, J. M.; WILLIS, I. Electron transfer and photoprotective properties of melanins in solution. **Pigment Cell Res.**, v. 10, p. 214-217, 1997.

MORAN, G. R. 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase. **Arch. Bioch. Bioph.**, v. 433, p. 117-128, 2005.

NAILOR, M. D.; SOBEL, J. D. Antibiotics for Gram-positive bacterial infection: vancomycin, teicoplanin, quinupristin/dalfopristin, oxazolidinones, daptomycin, telavancin and ceftaroline. **Med. Clin. North Am.**, v. 95, p. 723-742, 2011.

NIKOLOULI, K.; MOSSIALOS, D. Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered through genome-mining and metagenomics. **Biotechnol. Lett.**, v. 34, p. 1393-1403, 2012.

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S. L. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 38, p. 63-67, 1991.

PANG, H.; PENG, Z.; DUAN, C.-J.; MO, X.-C.; TANG, J.-L.; FENG, J.-X. Identification of cellulase genes from the metagenomes of compost soils and functional characterization of one novel endoglucanase. **Curr. Microbiol.**, v. 58, p. 404-408, 2009.

PARSLEY, L. C.; LINNEMAN, J.; GOODE, A. M.; BECKLUND, K.; GEORGE, I.; GOODMAN, R. M.; LOPANIK, N. B.; LILES, M. R. Polyketide synthase pathways identified from a metagenomic library are derived from soil *Acidobacteria*. **FEMS Microb. Ecol.**, v. 78, p. 176-187, 2011.

PENG, Q.; ZHANG, X.; SHANG, M.; WANG, X.; WANG, G.; LI, B.; GUAN, G.; LI, Y.; WANG, Y. A novel esterase gene cloned from a metagenomic library from neritic sediments of the South China Sea. **Microb. Cell Fact.**, v. 10, art. 95, 2011.

POTTKAEMPER, J.; BARTHEN, P.; ILMBERGER, N.; SCHWANEBERG, U.; SCHENK, A.; SCHULTE, M.; IGNATIEV, N.; STREIT, W. R. Applying metagenomics for the identification of bacterial cellulases that are stable in ionic liquids. **Green Chem.**, v. 11, p. 957-965, 2009.

QIN, J.; LI, Y.; CAI, Z.; LI, S.; ZHU, J.; ZHANG, F.; LIANG, S.; ZHANG, W.; GUAN, Y.; SHEN, D.; PENG, Y.; ZHANG, D.; JIE, Z.; WU, W.; QIN, Y.; XUE, W.; LI, J. HAN, L.; LU, D.; WU, P.; DAI, Y.; XUN, X.; LI, Z.; TANG, A.; ZHONG, S.; LI, X.; CHEN, W.; XU, R.; WANG, M.; FENG, Q.; GONG, M.; YU, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, M.; HANSEN, T.; SANCHEZ, G.; RAES, J.; FALONY, G.; OKUDA, S.; ALMEIDA, M.; LeCHATELIER, E.; RENAULT, P.; PONS, N.; BATTO, J.-M.; ZHANG, Z.; CHEN, H.; YANG, R.; ZHENG, W.; LI, S.; YANG, H.; WANG, J.; EHRLICH, D.; NIELSEN, R.; PEDERSEN, O.; KRISTIANSEN, K.; WANG, J. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. **Nature**, v. 490, p. 55-60, 2012.

RABUS, R. Functional genomics of an anaerobic aromatic-degrading denitrifying bacterium, strain EbN1. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 68, p. 580-587, 2005.

RUETSCHI, U.; ODELHOG, B.; LINDSTEDT, S.; BARROS-SODERLIN, J.; PERSSON, B.; JORNVALL, H. Characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase; primary structure of the *Pseudomonas* enzyme. **Eur. J. Biochem.**, v. 205, p. 459-466, 1992.

- RUTHERFORD, K.; PARKHILL, J.; CROOK, J.; HORSNELL, T.; RICE, P.; RAJANDREAM, M. A.; BARRELL, B. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, p. 944-945, 2000.
- SAITO, T.; ISHII, S.; OTSUKA, S.; NISHIYAMA, M.; SENOO, K. Identification of novel *Betaproteobacteria* in a succinate-assimilating population in denitrifying rice paddy soil by using stable isotope probing. **Microbes Environ.**, v. 23, p. 192-200, 2008.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press., 1989.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 14, p. 303-310, 2003.
- SEISHI, I.; TAKASHI, O.; MIZUE, A.; HIDEO, N.; MICHICO, Y.; SHUSEI, S.; TAKAKAZU, K.; SATOSHI, T.; SHIMA, E.; AYUMI, M.; KIMHIRO, T.; HISAYUKI, M.; KIWAMU, M. Community- and genome-bases views of plant-associated bacteria: plant-bacterial interactions in soybean and rice. **Plant Cell Phys.**, v. 51, p. 1398-1410, 2010.
- SHARMA, S.; KHAN, F. G.; QAZI, G. N. Molecular cloning and characterization of amylase from soil metagenomic library derived from Northwestern Himalayas. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 86, p. 1821-1828, 2010.
- SONNERWIRTH, A. C. **The enteric bacteria and bacterioides**, p. 645-672, 1980. In Ginsberg, H. S. (ed.), *Microbiology*, 3. ed., Harper & Row, Publishers, Inc., Philadelphia, PA.
- STEPANOVA, E. V., SHTIL, A. A.; LAVRENOV, S. N.; BUKHMAN, V. M.; INSHAKOV, A. N.; MIRCHINK, E. P.; TRENIN, A. S.; GALATENKO, O. A.; ISAKOVA, E. B.; GLAZUNOVA, V. A.; DEZHENKOVA, L. G. Tris(1-alkylindol-3-yl)methylum salts as a novel class of antitumor agents. **Russ. Chem. Bull., Intl. Ed.**, v. 59, pp. 2259-2267, 2010.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony method. **Mol. Biol. Evol.**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.
- TORSVIK, V.; GOKSEYR, J.; DAAE, F.L.; SERHEIM, R.; MICHALSEN, J.; SALTE, K. **Use of DNA analysis to determine the diversity of microbial communities**. In *Beyond the Biomass*. (Ritz, K., Dighton, J. & Giller, K.E., eds), p. 39-48, John Wiley & Sons, Chichester, 1994.
- TURICK, C. E.; CACCAVO, F. Jr, TISA, L. S. Electron transfer from *Shewanella algae* BrY to hydrous ferric oxide is mediated by cell-associated melanin. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 220, p. 99-104, 2003.
- WILD, J.; HRADECNA, Z.; SZYBALSKI, W. Conditionally amplifiable BACs: switching from single-copy to high-copy vector and genomic clones. **Genome Res.**, v. 12, p. 1434-1444, 2002.
- WILKINS, M. J.; VERBERKMOES, N. C.; WILLIAMS, K. H.; CALLISTER, S. J.; MOUSER, P. J.; ELIFANTS, H.; NCGUESSAN, L.; THOMAS, B. C.; NICORA, C. D.; SHAH, M. B.; ABRAHAM, P.; LIPTON, M. S.; LOVLEY, D. R.; HETTICH, R. L.; LONG, P. E.; BANFIELD, J. F. Proteogenomic monitoring of *Geobacter* physiology during stimulated uranium bioremediation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, p. 6591-6599, 2009.

WINTERMEYER, E.; FLUGEL, M.; OTT, M.; STEINERT, M.; RDEST, U.; MANN, K. H.; JACKER, J. Sequence determination and mutational analysis of the *lly* locus of *Legionella pneumophila*. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 1109-1117, 1994.

XINMIN, C.; HAOZE, H.; CHANGQUAN, G.; BAOLIN, S. Identification of two novel esterases from a marine metagenomic library derived from South China Sea. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 80, p. 615-625, 2008.

YABUUCHI, E.; OMYAMA, A. Characterization of "pyomelanin"-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Intl. J. Syst. Bacteriol.**, v. 22, p. 53-64, 1972.

YANG, C.; PFLUGRATH, J. W.; CAMPER, D. L.; FOSTER, M. L.; PERNICH, D. J.; WALSH, T. A. Structural basis for herbicidal inhibitor selectivity revealed by comparison of crystal structures of plant and mammalian 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenases. **Biochem.**, v. 43, p. 10414-10423, 2004.

ZAEHNER, H.; FIEDLER, F.P. **Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends.** In The Need for New Antibiotics Possible Ways Forward. Fifty-Third Symposium of the Society for General Microbiology, Bath, England, UK. (Hunter, P.A.; Darby, G.K.; Russel, H.J., eds.), p. 67-84, Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 1995.